

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 356**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2011 PCT/US2011/062445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12075037**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2011 E 11794336 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2646470**

54 Título: **Anticuerpos anti-receptor de transferrina de baja afinidad y su uso para transferir scFv terapéuticos a través de la barrera hematoencefálica**

30 Prioridad:

30.11.2010 US 418223 P

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

30.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DENNIS, MARK;
WATTS, RYAN JEFFERSON;
YU, YUNHUA JOY y
ZHANG, YIN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 631 356 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 de baja afinidad y su uso para transferir scFv terapéuticos a través de la barrera hematoencefálica

SOLICITUDES RELACIONADAS

La solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie 61/418.223 presentada el 30 de noviembre de 2010.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente solicitud se refiere a anticuerpos que se unen a receptores de la barrera hematoencefálica (R-BHE) y procedimientos de uso de los mismos.

ANTECEDENTES

La penetración en el cerebro de fármacos de molécula grande está severamente limitada por la barrera hematoencefálica (BHE) considerablemente impermeable. Entre las muchas estrategias para superar este obstáculo, está utilizar rutas de transporte de transcitosis de receptores endógenos expresados en el endotelio capilar cerebral. Se han diseñado proteínas recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales, contra estos receptores para permitir la entrega mediada por el receptor de moléculas grandes al cerebro. Sin embargo, las estrategias para maximizar la captación en el cerebro y minimizar la transcitosis inversa de vuelta a la sangre, y el grado de acumulación después de la dosis terapéutica, se mantienen sin explorar. Además, se desconoce si los anticuerpos que atraviesan la BHE son farmacodinámicamente funcionales.

SUMARIO

Los anticuerpos monoclonales tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurológicas del sistema nervioso central (SNC), pero su paso al cerebro está restringido por la barrera hematoencefálica (BHE). Estudios anteriores han demostrado que un porcentaje muy pequeño (aproximadamente 0,1 %) de una IgG que circula por el torrente sanguíneo cruza a través de la BHE para llegar al SNC (Felgenhauer, *Klin. Wschr.* 52: 1158-1164 (1974)), en los que la concentración del anticuerpo en el SNC puede ser insuficiente para permitir un efecto robusto. Aunque se han divulgado diferentes intentos de usar anticuerpos que se unen al receptor de transferrina (TfR) o al receptor de insulina humana (HIR) como un portador de proteínas de fusión siguiendo el concepto de un caballo de Troya molecular para atravesar la BHE (Boado *et al.*, *Pharmaceutics Molecular*, 7 (1): 237-244, 2010; Pardridge, *Bioengineered Bugs*, 1(4): 231-234, 2010; Boado *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*, 105(3), 15: 961-969, 2010), ninguna de estas investigaciones informa sobre la variación de la captación en el cerebro después de la disminución de la afinidad del anticuerpo anti-TfR o anti-HIR. Los procedimientos y composiciones de la invención proporcionan una forma de mejorar el porcentaje de anticuerpo que se distribuye en el SNC y, por lo tanto, de alcanzar más fácilmente las concentraciones terapéuticas de anticuerpos en el SNC.

En el presente documento se describe un grupo de anticuerpos contra el receptor de transferrina (TfR) que pueden entregar agentes terapéuticos, incluyendo anticuerpos y moléculas pequeñas, a través de la BHE, tanto de dosis traza como de dosis terapéuticamente relevantes después de una sola inyección sistémica en ratones. La distribución de anticuerpo cambió de vascular a neuronal 24 horas después de la inyección, lo que indica que una cantidad significativa de anticuerpo había realizado transcitosis a través de las células endoteliales del cerebro hasta alcanzar el parénquima. La magnitud de la captación y distribución de anticuerpos en el SNC estaba inversamente relacionada con su afinidad de unión al TfR para las variantes anti-TfR estudiadas. La prueba de transporte a través de la BHE se consiguió usando un anticuerpo biespecífico que se une tanto a TfR como a la enzima de escisión de la proteína precursora amiloide (PPA), la β -secretasa (BACE1). Una dosis sistémica única del anticuerpo biespecífico anti-TfR/BACE1 diseñado usando la metodología de la invención no solamente dio lugar a una captación significativa de anticuerpos en el cerebro, sino también a niveles drásticamente reducidos de $A\beta_{1-40}$ en el cerebro en comparación con anti-BACE1 mono-específico solo, lo que sugiere que la penetrancia en la BHE afecta a la potencia de anti-BACE1. Del mismo modo, se demostró que un anticuerpo biespecífico que se une tanto a TfR como a beta amiloide (es decir, una parte de PPA que resulta de la escisión por BACE1 de PPA, que es uno de los principales constituyentes de las placas amiloides) pasaba fácilmente al cerebro usando la metodología de la invención. Los datos y los experimentos descritos en el presente documento ponen de relieve varios mecanismos causales que están detrás del aumento de la captación de un anticuerpo en el SNC usando una estrategia de anticuerpos de afinidad más baja. En primer lugar, los anticuerpos anti-receptor de BHE (R-BHE) de alta afinidad (p. ej., anti-TfR^A) limitan la captación en el cerebro saturando rápidamente los R-BHE en la vasculatura del cerebro, lo que reduce la cantidad total de anticuerpo captado por el cerebro y también restringe su distribución a la vasculatura. Sorprendentemente, la reducción de la afinidad por los R-BHE mejora la captación y la distribución cerebral, con un robusto cambio observado en la localización de la vasculatura a las neuronas y el neuropilo asociado distribuido por el SNC. En segundo lugar, se propone la menor afinidad del anticuerpo por los R-BHE para alterar la capacidad del anticuerpo de regresar al lado vascular de la BHE a través de los R-BHE desde el lado del SNC de la membrana debido a que la afinidad global del anticuerpo por los R-BHE es baja y la concentración local del

anticuerpo en el lado del SNC de la BHE es de no-saturación debido a la rápida dispersión del anticuerpo por el compartimento de SNC. En tercer lugar, *in vivo*, y como se observa para el sistema TfR, los anticuerpos con menos afinidad por los R-BHE no se eliminan del sistema tan eficazmente como los que tienen mayor afinidad por los R-BHE y, por lo tanto, permanecen en concentraciones circulantes mayores que sus homólogos de mayor afinidad. Esto es ventajoso debido a que los niveles de anticuerpos circulantes del anticuerpo de menor afinidad se mantienen a niveles terapéuticos durante un período de tiempo más largo que el anticuerpo de mayor afinidad que, por lo tanto, mejora la captación de anticuerpo en el cerebro durante un período 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. Anti-TfR/BACE1 y anti-TfR/Abeta son candidatos terapéuticos prometedores y novedosos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Además, la tecnología de diana biespecífica basada en el transporte mediado por receptores (TMR) abre la puerta a una amplia gama de posibles agentes terapéuticos para las enfermedades del SNC. La invención proporciona procedimientos de diseño de agentes terapéuticos que penetran en la BHE que mejoran en gran medida el transporte a través de la BHE y la distribución en el SNC del agente terapéutico.

En consecuencia, en un primer modo de realización, la invención proporciona un procedimiento de transporte de un compuesto a través de la barrera hematoencefálica, que comprende la exposición de un anticuerpo que se une con baja afinidad a un receptor de la barrera hematoencefálica (R-BHE) acoplado a un compuesto a la barrera hematoencefálica, de modo que el anticuerpo transporta el compuesto acoplado al mismo a través de la barrera hematoencefálica. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente para la formación de imágenes. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de una manera tal que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto, la BHE está en un mamífero. En otro de dichos aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de dichos aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de dichos aspectos, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en 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 y lesión cerebral traumática. En otro aspecto, la BHE está en un ser humano.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene una CI50 para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μ M. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μ M. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μ M. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando un ELISA de competición.

En otro aspecto, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor de IGF), proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). En otro de dichos aspectos, el R-BHE es un R-BHE humano. En uno de dichos aspectos, el R-BHE es TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado a compuesto se administra a una dosis terapéutica. En uno de dichos aspectos, la dosis terapéutica es una dosis que satura el R-BHE al que se une específicamente el anticuerpo.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado covalentemente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el compuesto se une al anticuerpo mediante un engarce. En uno de dichos aspectos, el engarce es escindible. En otro de dichos aspectos, el engarce no es escindible. En otro de dichos aspectos, el compuesto se une directamente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una parte del anticuerpo multiespecífico. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión al

antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro de dichos aspectos, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto se acopla de forma reversible al anticuerpo de modo que el compuesto se libera del anticuerpo concurrente con o después del transporte en la BHE.

En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la exposición del SNC a un compuesto, en el que el compuesto se acopla a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE, aumentando de este modo la exposición del SNC al compuesto. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente para la formación de imágenes. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de una manera tal que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto, el compuesto acoplado a anticuerpo se administra a un mamífero. En otro de dichos aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de dichos aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de dichos aspectos, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en 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 y lesión cerebral traumática.

En otro aspecto, el aumento en la exposición del SNC al compuesto se mide en relación a la exposición del SNC de un compuesto acoplado con un anticuerpo típico que no tiene afinidad disminuida por el R-BHE. En otro aspecto, el aumento en la exposición del SNC al compuesto se mide como una proporción de la cantidad del compuesto encontrada en el SNC en relación con la cantidad encontrada en el suero después de la administración. En otro de dichos aspectos, el aumento en la exposición del SNC da como resultado una proporción superior a un 0,1 %. En otro aspecto, el aumento en la exposición del SNC al compuesto se mide en relación a la exposición del SNC de un compuesto en ausencia de un anticuerpo acoplado. En otro aspecto, el aumento en la exposición del SNC al compuesto se mide por formación de imágenes. En otro aspecto, el aumento en la exposición del SNC al compuesto se mide por una lectura indirecta tal como una modificación de uno o más síntomas fisiológicos.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene una CI50 para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 µM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando un ELISA de competición.

En otro aspecto, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor de IGF), proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). En otro de dichos aspectos, el R-BHE es un R-BHE humano. En uno de dichos aspectos, el R-BHE es TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado a compuesto se administra a una dosis terapéutica. En uno de dichos aspectos, la dosis terapéutica es una dosis que satura el R-BHE al que se une específicamente el anticuerpo.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado covalentemente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el compuesto se une al anticuerpo mediante un engarce. En uno de dichos aspectos, el engarce es escindible. En otro de dichos

aspectos, el engarce no es escindible. En otro de dichos aspectos, el compuesto se une directamente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una parte del anticuerpo multiespecífico. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro de dichos aspectos, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto se acopla de forma reversible al anticuerpo de modo que el compuesto se libera del anticuerpo concurrente con o después del transporte en la BHE.

En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para disminuir la eliminación de un compuesto administrado a un sujeto, en el que el compuesto se acopla a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE, de modo que la eliminación del compuesto se reduce. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente para la formación de imágenes. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de una manera tal que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto, el sujeto es un mamífero. En otro de dichos aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de dichos aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de dichos aspectos, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en 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 y lesión cerebral traumática.

En otro aspecto, la disminución en la eliminación del compuesto se mide en relación a la eliminación de un compuesto acoplado a un anticuerpo típico que no tiene afinidad disminuida por el R-BHE. En otro aspecto, la disminución en la eliminación del compuesto se mide en relación a la eliminación del compuesto en ausencia de un anticuerpo acoplado.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene una CI50 para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 µM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando un ELISA de competición.

En otro aspecto, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor de IGF), proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). En otro de dichos aspectos, el R-BHE es un R-BHE humano. En uno de dichos aspectos, el R-BHE es TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado a compuesto se administra a una dosis terapéutica. En uno de dichos aspectos, la dosis terapéutica es una dosis que satura el R-BHE al que se une específicamente el anticuerpo.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado covalentemente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el compuesto se une al anticuerpo mediante un engarce. En uno de dichos aspectos, el engarce es escindible. En otro de dichos aspectos, el engarce no es escindible. En otro de dichos aspectos, el compuesto se une directamente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una parte del anticuerpo multiespecífico. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión al

antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro de dichos aspectos, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto se acopla de forma reversible al anticuerpo de modo que el compuesto se libera del anticuerpo concurrente con o después del transporte en la BHE.

Un procedimiento para aumentar la retención en el SNC de un compuesto administrado a un sujeto, en el que el compuesto se acopla a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE, de modo que la retención en el SNC del compuesto se incrementa. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente para la formación de imágenes. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de una manera tal que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto, el compuesto se administra a un mamífero. En otro de dichos aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de dichos aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de dichos aspectos, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en 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 y lesión cerebral traumática.

En otro aspecto, el aumento en la retención del SNC del compuesto se mide en relación a la retención del SNC de un compuesto acoplado con un anticuerpo típico que no tiene afinidad disminuida por el R-BHE. En otro aspecto, el aumento en la retención del SNC del compuesto se mide como una proporción de la cantidad del compuesto encontrada en el SNC en relación con la cantidad encontrada en el suero en uno o más puntos temporales después de la administración. En otro de dichos aspectos, el aumento en la retención del SNC da como resultado una proporción superior a un 0,1 % en uno o más puntos temporales después de la administración. En otro aspecto, el aumento en la retención de SNC del compuesto se mide en relación a la retención del SNC de un compuesto en ausencia de un anticuerpo acoplado. En otro aspecto, el aumento en la retención de SNC del compuesto se mide por formación de imágenes. En otro aspecto, el aumento en la retención de SNC del compuesto se mide por una lectura indirecta tal como una modificación de uno o más síntomas fisiológicos.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene una CI50 para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 µM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando un ELISA de competición.

En otro aspecto, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor de IGF), proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). En otro de dichos aspectos, el R-BHE es un R-BHE humano. En uno de dichos aspectos, el R-BHE es TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado a compuesto se administra a una dosis terapéutica. En uno de dichos aspectos, la dosis terapéutica es una dosis que satura el R-BHE al que se une específicamente el anticuerpo.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado covalentemente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el compuesto se une al anticuerpo mediante un engarce. En uno de dichos aspectos, el engarce es escindible. En otro de dichos aspectos, el engarce no es escindible. En otro de dichos aspectos, el compuesto se une directamente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una parte del anticuerpo multiespecífico. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro de dichos aspectos, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto se acopla de forma reversible al anticuerpo de modo que el compuesto se libera del anticuerpo concurrente con o después del transporte en la BHE.

En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para optimizar la farmacocinética y/o la farmacodinámica de un compuesto para ser eficaz en el SNC de un sujeto, en el que el compuesto se acopla a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE, y el anticuerpo se selecciona de manera que su afinidad por el R-BHE después del acoplamiento al compuesto de como resultado una cantidad de transporte del anticuerpo conjugado con el compuesto a través de la BHE que optimiza la farmacocinética y/o la farmacodinámica del compuesto en el SNC. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente para la formación de imágenes. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de una manera tal que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto, la BHE está en un mamífero. En otro de dichos aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de dichos aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de dichos aspectos, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en 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 y lesión cerebral traumática. En otro aspecto, la BHE está en un ser humano.

En un aspecto, la optimización puede incluir la generación de una serie de complejos anticuerpo-compuesto en los que cada anticuerpo tiene una afinidad diferente por el R-BHE, y la evaluación de la farmacocinética y/o la farmacodinámica de cada uno en el SNC. En otro aspecto, la optimización puede ser relativa a un estándar conocido, tal como, pero no limitado a, la farmacocinética y/o la farmacodinámica del compuesto cuando se introduce directamente en el SNC o cuando se introduce en el sujeto en ausencia de un anticuerpo anti-R-BHE acoplado.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene una CI50 para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μ M. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μ M. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μ M. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando un ELISA de competición.

En otro aspecto, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor de IGF), proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). En otro de dichos aspectos, el R-BHE es un R-BHE humano. En uno de dichos aspectos, el R-BHE es TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado a compuesto se administra a una dosis terapéutica. En

uno de dichos aspectos, la dosis terapéutica es una dosis que satura el R-BHE al que se une específicamente el anticuerpo.

5 En otro aspecto, el compuesto está acoplado covalentemente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el compuesto se une al anticuerpo mediante un engarce. En uno de dichos aspectos, el engarce es escindible. En otro de dichos aspectos, el engarce no es escindible. En otro de dichos aspectos, el compuesto se une directamente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una parte del anticuerpo multiespecífico. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro de dichos aspectos, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto se acopla de forma reversible al anticuerpo de modo que el compuesto se libera del anticuerpo concurrente con o después del transporte en la BHE.

20 En otro modo de realización, la solicitud proporciona un procedimiento para tratar un trastorno neurológico en un mamífero, que comprende tratar al mamífero con un anticuerpo que se une a un R-BHE y está acoplado a un compuesto, en el que el anticuerpo se ha seleccionado para que tenga una baja afinidad por el R-BHE y mejore de ese modo la captación en el SNC del anticuerpo y del compuesto acoplado. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente para la formación de imágenes. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de una manera tal que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En un aspecto, el mamífero es un ser humano. En otro de dichos aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de dichos aspectos, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en 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 y lesión cerebral traumática.

35 En un aspecto, el tratamiento da como resultado una disminución o eliminación de los síntomas del trastorno. En otro aspecto, el tratamiento da como resultado una mejora del trastorno neurológico.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene una CI50 para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 µM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando un ELISA de competición.

60 En otro aspecto, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor de IGF), proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). En otro de dichos aspectos, el R-BHE es un R-BHE humano. En uno de dichos aspectos, el R-BHE es TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado a compuesto se administra a una dosis terapéutica. En uno de dichos aspectos, la dosis terapéutica es una dosis que satura el R-BHE al que se une específicamente el anticuerpo.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado covalentemente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el compuesto se une al anticuerpo mediante un engarce. En uno de dichos aspectos, el engarce es escindible. En otro de dichos aspectos, el engarce no es escindible. En otro de dichos aspectos, el compuesto se une directamente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una parte del anticuerpo multiespecífico. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro de dichos aspectos, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto se acopla de forma reversible al anticuerpo de modo que el compuesto se libera del anticuerpo concurrente con o después del transporte en la BHE.

En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo útil para el transporte de un compuesto a través de la BHE, que comprende seleccionar un anticuerpo específico para un receptor de la barrera hematoencefálica (R-BHE), ya que tiene una afinidad deseablemente baja por el R-BHE.

En un aspecto, el anticuerpo se selecciona de un panel de anticuerpos basándose en la afinidad del anticuerpo seleccionado. En otro aspecto, el anticuerpo se ha diseñado para tener la afinidad. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo se genera utilizando cualquier metodología de ingeniería de proteínas conocida en la técnica incluyendo, pero no limitado a, presentación en fagos, presentación en levadura, mutagénesis aleatoria y mutagénesis dirigida al sitio.

En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente para la formación de imágenes. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de una manera tal que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto, la BHE está en un mamífero. En otro de dichos aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de dichos aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de dichos aspectos, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en 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 y lesión cerebral traumática. En otro aspecto, la BHE está en un ser humano.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene una CI50 para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 µM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando un ELISA de competición.

En otro aspecto, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor de IGF), proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). En otro de dichos aspectos, el R-BHE es un R-BHE humano. En uno de dichos aspectos, el R-BHE es TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado a compuesto se administra a una dosis terapéutica. En uno de dichos aspectos, la dosis terapéutica es una dosis que satura el R-BHE al que se une específicamente el anticuerpo.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado covalentemente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el compuesto se une al anticuerpo mediante un engarce. En uno de dichos aspectos, el engarce es escindible. En otro de dichos aspectos, el engarce no es escindible. En otro de dichos aspectos, el compuesto se une directamente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una parte del anticuerpo multiespecífico. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro de dichos aspectos, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto se acopla de forma reversible al anticuerpo de modo que el compuesto se libera del anticuerpo concurrente con o después del transporte en la BHE.

En otro modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un receptor de la barrera hematoencefálica (R-BHE) con baja afinidad. En un aspecto, la afinidad del anticuerpo por el R-BHE es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 µM. En otro aspecto, la afinidad del anticuerpo por el R-BHE es de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 1 µM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una CI50 para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, la CI50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo, cuando se acopla a un compuesto, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto se une específicamente a TfR y tiene una CI50 para TfR entre las CI50 observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y para el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-R-BHE o del anti-R-BHE/compuesto por el R-BHE se mide usando un ELISA de competición.

En otro aspecto, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor de IGF), proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). En uno de dichos aspectos, el R-BHE es TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro de dichos aspectos, el R-BHE es un R-BHE humano.

En otro aspecto, el anticuerpo está acoplado a un compuesto. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente para la formación de imágenes. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de una manera tal que no inhibe la unión del TfR a la transferrina.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado covalentemente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el compuesto se une al anticuerpo mediante un engarce. En uno de dichos aspectos, el engarce es escindible. En otro de dichos aspectos, el engarce no es escindible. En otro de dichos aspectos, el compuesto se une directamente al anticuerpo. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una parte del anticuerpo multiespecífico. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro de dichos aspectos, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el

compuesto se acopla de forma reversible al anticuerpo de modo que el compuesto se libera del anticuerpo concurrente con o después del transporte en la BHE.

5 En otro aspecto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo con una región de unión a antígeno que se une al R-BHE incluyendo, pero no limitado a, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

10 En otro modo de realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico. Cualquiera de los anticuerpos anti-R-BHE de baja afinidad anteriormente descritos o cualquiera de los anticuerpos anti-R-BHE de baja afinidad descritos en otra parte del presente documento se pueden ser usar en el procedimiento.

15 En otro modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico. Cualquiera de los anticuerpos anti-R-BHE de baja afinidad anteriormente descritos o cualquiera de los anticuerpos anti-R-BHE de baja afinidad descritos en otra parte del presente documento se pueden ser usar en el procedimiento. En consecuencia, en un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un receptor de la barrera hematoencefálica (R-BHE), en el que la afinidad del anticuerpo por el R-BHE es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM (p. ej., de aproximadamente 20 nM a aproximadamente con 1 μM). Opcionalmente, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor IGF), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1), proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8) y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). Opcionalmente, el anticuerpo se acopla con un compuesto terapéutico, tal como un fármaco para trastornos neurológicos.

25 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral, por ejemplo, en el que el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), beta amiloide (Abeta), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína A3 (ApoE3), apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. El anticuerpo (p. ej., anticuerpo multiespecífico) incluye fragmentos de anticuerpo y anticuerpos de longitud completa.

35 En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento de transporte de un compuesto terapéutico, tal como un fármaco para trastornos neurológicos, a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer el anticuerpo anti-R-BHE acoplado a un fármaco para trastornos neurológicos a la barrera hematoencefálica, de modo que el anticuerpo transporta el fármaco para trastornos neurológicos acoplado al mismo a través de la barrera hematoencefálica. La barrera hematoencefálica en este procedimiento puede ser de un mamífero, por ejemplo, uno con un trastorno neurológico, cuyos ejemplos incluyen: enfermedad de Alzheimer (EA) (incluyendo, pero no limitado a, deterioro cognitivo leve y EA prodrómica), 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 (p. ej., cáncer que afecta el SNC o al cerebro) y lesión cerebral traumática.

45 La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento de preparación de un anticuerpo útil para transportar un compuesto terapéutico tal como un fármaco para trastornos neurológicos a través de la barrera hematoencefálica, que comprende seleccionar un anticuerpo contra un receptor de la barrera hematoencefálica (R-BHE), ya que tiene una afinidad por el R-BHE que es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM. En un modo de realización, el anticuerpo se selecciona de un panel de anticuerpos porque tiene la afinidad deseada. De forma alternativa, o adicionalmente, el anticuerpo se ha diseñado para tener la afinidad deseada. El procedimiento, además, comprende opcionalmente acoplar el anticuerpo a un compuesto terapéutico tal como un fármaco para trastornos neurológicos. Por ejemplo, el procedimiento puede comprender la preparación de un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión de antígeno que se une a un antígeno cerebral.

50 La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para tratar un trastorno neurológico en un mamífero, que comprende tratar al mamífero con un anticuerpo multiespecífico que se une tanto a un receptor de la barrera hematoencefálica (R-BHE) como a un antígeno cerebral, en el que el anticuerpo anti-R-BHE se ha seleccionado para que tenga una baja afinidad por R-BHE y mejora de ese modo la captación en el cerebro del anticuerpo anti-antígeno cerebral. Opcionalmente, el anticuerpo multiespecífico se une tanto al receptor de transferrina (TfR) como a BACE1 o Abeta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A-E representan una captación vascular cerebral significativa del anticuerpo anti-TfR administrado sistémicamente. La figura 1A muestra la captación en el cerebro después de la administración IV de dosis traza (aproximadamente 50 µg/kg) de [¹³¹I]anti-TfR^A y [¹²⁵I]IgG de control en ratones y se cuantificó como una media del porcentaje de dosis inyectada por gramo de cerebro 5, 30 min, 1, 4, 24, 48, y 72 horas después de la inyección IV (n = 6). La captación de [¹³¹I]anti-TfR^A se redujo por inyección con 4 mg/kg de anti-TfR^A no marcado (frío). La figura 1B muestra la cuantificación de la captación media de anticuerpos en el cerebro 1 y 24 horas después de una inyección IV de 20 mg/kg de IgG de control o anti-TfR^A (**p = 0,0002, n = 10). La figura 1C muestra la proporción de las concentraciones porcentuales medias en cerebro a suero (**p = 0,003, n = 10). Las figuras 1D y 1E representan la tinción inmunohistoquímica de secciones cerebrales después de la inyección IV con anti-TfR^A (figura 1D, paneles superiores), que muestra la colocalización con anti-colágeno IV, un marcador vascular (panel inferior). La inyección IV con IgG de control (figura 1E, paneles superiores) muestra la distribución vascular en el cerebro después de tan sólo 1 hora y una ausencia de anticuerpo después de 24 horas. Barra de escala = 50 µm.

Las figuras 2A-F muestran que la afinidad de los anticuerpos anti-TfR y el grado de captación en el cerebro están inversamente relacionados cuando se administran a una dosis terapéuticamente relevante (20 mg/kg) en comparación con una dosis traza baja (aproximadamente 50 µg/kg). La figura 2A representa un ELISA de unión competitiva en el que se usan concentraciones crecientes de anticuerpos variantes anti-TfR^A, B, C, D, E para competir contra TfR^A biotinilado por la unión a TfR. El ELISA de competición anti-TfR se realizó en placas Maxisorp (Neptuno, N.J.) recubiertas con 2,5 µg/ml de dominio extracelular TfR murino purificado en PBS a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Una valoración de anti-TfR^A, anti-TfR^B, anti-TfR^C o anti-TfR^D (dilución en serie 1:3) se combinó con anti-TfR^A biotinilado (concentración final 0,5 nM) y se añadió a la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con Tween 20 al 0,05 % en PBS, se añadió HRP-estreptavidina (Southern Biotech, Birmingham) a la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con Tween 20 al 0,05 % en PBS, y se detectó el anti-TfR^A biotinilado unido a la placa usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Los resultados de la figura 2A presentan los datos de un único experimento en el que se evaluaron por separado las cinco variantes anti-TfR. Los valores de CI50 determinados a partir de estos datos se muestran en la tabla 2. La figura 2B representa la cuantificación de la captación en el cerebro media después de la inyección IV de dosis traza (aproximadamente 50 µg/kg) de las variantes [¹²⁵I]anti-TfR^{A, B, C, D, E} después de 5 min, 1, 4, 6 y 24 horas (n = 3). Los resultados de la figura 2B presentan los datos de un único experimento en el que se evaluaron por separado las cinco variantes anti-TfR. La figura 2C muestra la cuantificación de la captación en el cerebro media después de la inyección IV de 20 mg/kg de variantes anti-TfR en 1 y 24 horas usando los procedimientos descritos con respecto a la figura 1B. El experimento se repitió en las mismas condiciones usando anti-TfR^E y todos los resultados se presentan en la figura 2C. La figura 2D es un modelo que ilustra la relación inversa entre la afinidad y la captación en el cerebro. La figura 2E es una comparación de la tinción inmunohistoquímica de secciones cerebrales después de la inyección IV con anticuerpos anti-TfR^A de alta afinidad o anti-TfR^{B, C, D} de menor afinidad en la que se muestran las diferencias en la distribución de anticuerpos (la tinción en los paneles de la izquierda corresponde a anti-TfR solo) y el grado de colocalización con NeuN (la tinción en los paneles de la derecha corresponde tanto a anti-TfR como a NeuN). Barra de escala = 50 µm. La figura 2F es una imagen de gran aumento representativa de la localización de anti-TfR^D en las neuronas (indicada por la tinción de NeuN); estos datos muestran que el anti-TfR^D y el NeuN se colocalizan y, por lo tanto, que el anti-TfR^D atraviesa la BHE e interactúa con las neuronas, mientras que el anti-TfR^A se localiza principalmente en la vasculatura, a diferencia de las neuronas. Barra de escala = 20 µm.

Las figuras 3A-G muestran que un anticuerpo biespecífico anti-TfR/BACE1 inhibe Aβ *in vitro* y se acumula en el cerebro. La figura 3A es un modelo esquemático de un anticuerpo biespecífico que se diseñó para unirse tanto a TfR como a β-secretasa (BACE1). La figura 3B muestra la afinidad de unión por TfR del anti-TfR^A precursor y anti-TfR^A/BACE1, medida por el ensayo ELISA de competición anti-TfR descrito anteriormente para la figura 2A. La figura 3C muestra la cuantificación de los niveles de Aβ producidos por células HEK293 que expresan de forma estable PPA después del tratamiento con anti-TfR^A/BACE1, anti-BACE1 e IgG de control en un ensayo celular. La capacidad de los anticuerpos de inhibir la producción de Aβ1-40 en células HEK293 que expresan de forma estable la proteína precursora amiloide humana natural se evaluó como sigue. Se sembraron células HEK293-APPWT durante la noche a una densidad de 3 x 10⁴ células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron 50 µl de medio fresco (DMEM + FBS al 10 %) que contiene un anticuerpo anti-BACE1 o un anticuerpo IgG1 de control con las células durante 24 horas a 37 °C. El medio celular se recogió y se sometió a ensayo para determinar la presencia de Aβ1-40 usando un ensayo Aβ1-40 HTRF® (Cisbio) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de Aβ1-40 se normalizaron para la viabilidad celular, que se determina usando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo (Promega). Los experimentos se realizaron al menos tres veces, y cada punto en cada experimento se repitió por duplicado. La figura 3D representa la cuantificación de la captación en el cerebro media después de dosis traza de anticuerpo marcado con [¹²⁵I] 30 min, 6, 24 y 48 horas después de la inyección IV en ratones (n = 4). La figura 3E muestra la cuantificación de la captación media de anticuerpos en el cerebro y la figura 3F la proporción promedio en cerebro a suero de 1, 12, 24 y 48 horas después de una inyección IV de 20 mg/kg de anticuerpo en ratones (n = 10). Los experimentos de las figuras 3E y 3F se realizaron utilizando el mismo protocolo que en el experimento descrito en relación con la figura 1B. La figura 3G muestra la tinción inmunohistoquímica de secciones cerebrales de ratones 24 horas después de la inyección IV con cualquiera de anti-TfR/BACE1 (paneles de la izquierda) o IgG de control (paneles de la derecha). Se observa

colocalización del anticuerpo con NeuN después del tratamiento con anti-TfR^A/BACE1 (panel superior derecho, la tinción neuronal de NeuN coincide con la tinción de anticuerpos generalizada), pero está ausente en los ratones tratados con IgG de control (panel inferior derecho, sólo se observa el patrón de tinción neuronal de NeuN, sin tinción de anticuerpos).

5 Las figuras 4A-E muestran que una única dosis sistémica de anti-TfR^A/BACE1 reduce significativamente los niveles centrales y periféricos de A β ₁₋₄₀. Las figuras 4A-D muestran la cuantificación de los niveles cerebrales (A, B) y plasmáticos (C, D) de A β ₁₋₄₀ después de una inyección IV de 25 mg/kg o 50 mg/kg de IgG de control, anti-BACE1 o anti-TfR/BACE1. Brevemente, para las mediciones de Abeta1-40, los hemisferios cerebrales se homogeneizaron en tampón clorhidrato de guanidina 5 M y las muestras se agitaron durante 3 horas a temperatura ambiente antes de su dilución (1:10) en caseína al 0,25 %, EDTA 5 mM (pH 8,0) en PBS que contenía aprotinina (20 mg/ml) y leupeptina (10 mg/ml) recién añadidas. Los homogenizados diluidos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 min y los sobrenadantes se aislaron para la medición de Abeta1-40. Para las mediciones de la concentración de anticuerpos, el hemisferio cerebral correspondiente de cada ratón se homogeneizó en NP-40 al 1 % como se describe anteriormente. Se recogió sangre completa en tubos microtainer con EDTA (BD Diagnostics) antes de la perfusión, se centrifugaron a 5000 g durante 15 minutos y el sobrenadante se aisló para medir las concentraciones en plasma de Abeta1-40 de ratón y anti-TfR/BACE1. Las concentraciones de Abeta1-40 de ratón total en plasma y en cerebro se determinaron utilizando un ELISA de tipo sándwich siguiendo procedimientos similares descritos anteriormente. Se recubrió anticuerpo policlonal de conejo específico para el extremo C-terminal de Abeta1-40 (Millipore, Bedford MA) sobre placas y se usó anticuerpo monoclonal anti-Abeta de ratón biotinilado M3.2 (Covance, Dedham MA) para la detección. El ensayo tenía un límite inferior de valores de cuantificación de 1,96 pg/ml en plasma y de 39,1 pg/g en cerebro. El análisis estadístico de las diferencias entre los grupos experimentales se realizó mediante una prueba de la T para datos independientes bilateral. * representa significancia en comparación con IgG de control, mientras que # representa significancia en comparación con anti-BACE1. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; n = 10 para todos los grupos. La figura 4E muestra la reducción media de A β ₁₋₄₀ a partir de datos de (A-D), calculada como porcentaje de los niveles de A β ₁₋₄₀ en relación con los ratones a los que se les inyectó IgG de control.

30 Las figuras 5A-B representan las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada del clon YW412.8 anti-BACE1 obtenido de una categoría no expuesta de la biblioteca de presentación en fagos de diversidad natural y formas de afinidad madurada de YW412.8. La figura 5A representa las alineaciones de secuencias de la cadena ligera variable (VL) (SEQ ID NO 1-6). La figura 5B representa las alineaciones de secuencias de la cadena pesada variable (VH) (SEQ ID NO 7-8). En ambas figuras, las secuencias HVR para cada clon se indican por las regiones enmarcadas, indicando el primer recuadro HVR-L1 (figura 5A) o HVR-H1 (figura 5B), indicando el segundo recuadro HVR-L2 (figura 5A) o HVR-H2 (figura 5B) e indicando el tercer recuadro HVR-L3 (figura 5A) o HVR-H3 (figura 5B).

35 Las figuras 6A-B representan las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada del clon Fab 12 obtenido de una categoría no expuesta de la biblioteca de presentación en fagos de diversidad sintética y formas de afinidad madurada de Fab 12. La figura 6A representa las alineaciones de secuencias de la cadena ligera (SEQ ID NO 9-12). La figura 6B representa las alineaciones de secuencias de la cadena pesada (SEQ ID NO 13). En ambas figuras, las secuencias HVR para cada clon se indican por las regiones enmarcadas, indicando el primer recuadro HVR-L1 (figura 6A) o HVR-H1 (figura 6B), indicando el segundo recuadro HVR-L2 (figura 6A) o HVR-H2 (figura 6B) e indicando el tercer recuadro HVR-L3 (figura 6A) o HVR-H3 (figura 6B).

45 Las figuras 7A-B representan la cadena pesada (figura 7A; SEQ ID NO 14) y la cadena ligera (figura 7B; SEQ ID NO 15) de un anticuerpo anti-Abeta de ejemplo.

50 Las figuras 8A-B representan la cuantificación de anti-TfR^{A, B, C, D, E} en suero (figura 8A) y en cerebro (figura 8B) después de una sola administración de una dosis terapéutica en ratones. Se usaron ratones C57B/6 hembra naturales de 6-8 semanas de edad en todos los estudios. A los ratones se les inyectó por vía intravenosa 20 mg/kg de variantes anti-TfR o IgG de control. Los niveles de anticuerpos en cerebro y en suero se midieron 1 y 12 horas y 1, 2, 4, 5, 6 y 8 días después de la inyección. El volumen total de inyección no superó los 260 μ l y los anticuerpos se diluyeron en PBS-D (Invitrogen) cuando fue necesario. El experimento se realizó usando el mismo protocolo que el experimento cuyos resultados se muestran en la figura 1B.

55 Las figuras 9A-E muestran los diversos grados de acumulación de los anticuerpos anti-TfR^{A, D, E}/BACE1 biespecíficos en el cerebro y de inhibición de la producción de A β *in vivo*. La figura 9A representa los resultados de un ensayo ELISA de competición anti-TfR usando anti-TfR^{A, D, E}/BACE1, siguiendo el mismo procedimiento de ensayo que el descrito en la figura 2A. Los valores de C150 determinados a partir de estos datos se muestran en la tabla 3. Las figuras 9B y 9D cuantifican la cantidad de anticuerpo (9B) observada y la cantidad de Abeta1-40 (9D) observada en el plasma 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días después de una inyección IV de 50 mg/kg de anticuerpos en ratones (n = 6). La figura 9C representa la cuantificación de la captación en el cerebro media y la figura 9E representa la cantidad de Abeta1-40 observada en los cerebros de esos mismos ratones tratados 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días después del tratamiento. Se usaron ratones C57B/6 hembra naturales de 6-8 semanas de edad en todos los estudios. A los ratones se les inyectó por vía intravenosa 50 mg/kg de variantes anti-TfR/BACE1, IgG de control o anti-BACE1. Después del tiempo indicado, los ratones se sometieron a perfusión con PBS-D, y se midió la concentración del anticuerpo en cerebro y plasma para cada animal, como se describe anteriormente. El ensayo se realizó tal como se describe en la descripción de la figura 4.

Las figuras 10 y 11 muestran los diversos grados de acumulación de los anticuerpos anti-TfR^{A, D, E}/Abeta biespecíficos en el cerebro de ratones PS2APP (figura 12) y de ratones naturales (figura 13). Las figuras 10A y 11A representan la cuantificación de la cantidad de anticuerpo observada en plasma 1 día después de una inyección IP de 50 mg/kg de anticuerpos en ratones (n = 4-6). Las figuras 10B y 11B cuantifican la captación en el cerebro media en los mismos ratones tratados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

La "barrera hematoencefálica" o "BHE" se refiere a la barrera fisiológica existente entre la circulación periférica y el cerebro y la médula espinal que está formada por uniones estrechas dentro de las membranas plasmáticas del endotelio capilar del cerebro, creando una barrera estrecha que restringe el transporte de moléculas al cerebro, incluso de moléculas muy pequeñas tales como urea (60 daltons). La barrera hematoencefálica del cerebro, la barrera hematomedular de la médula espinal y la barrera hematorretiniana de la retina son barreras capilares contiguas del SNC, y se denominan colectivamente en el presente documento la barrera hematoencefálica o BHE. La BHE también abarca la barrera hematocefalorraquídea (plexo coroideo) en la que la barrera comprende células endoteliales en lugar de células endoteliales capilares.

El "sistema nervioso central" o "SNC" se refiere al complejo de tejidos nerviosos que controlan la función corporal, e incluye el cerebro y la médula espinal.

Un "receptor de la barrera hematoencefálica" (abreviado "R-BHE" en el presente documento) es una proteína de receptor transmembrana expresada en las células endoteliales del cerebro, que es capaz de transportar moléculas a través de la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de R-BHE en el presente documento incluyen: receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (R-IGF), receptores de lipoproteínas de baja densidad incluyendo, 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 el factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). Un ejemplo de R-BHE en el presente documento es el receptor de transferrina (TfR).

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

Un "trastorno neurológico", como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad o trastorno que afecta al SNC y/o que tiene una etiología en el SNC. Los ejemplos de enfermedades o trastornos del SNC incluyen, pero no se limitan a, neuropatía, amiloidosis, cáncer, una enfermedad o trastorno ocular, infección vírica o microbiana, inflamación, isquemia, enfermedad neurodegenerativa, convulsiones, trastornos del comportamiento y una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Para los fines de la presente solicitud, se entenderá que el SNC incluye el ojo, que normalmente está separado del resto del cuerpo por la barrera hematorretiniana. Los ejemplos específicos de trastornos neurológicos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades neurodegenerativas (incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome de pospoliomielitis, síndrome de Shy-Draeger, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Parkinson, atrofia de múltiples sistemas, degeneración estriatonigral, tauopatías (incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear), enfermedades priónicas (incluyendo, pero no limitado a, encefalopatía espongiiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt-Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, caquexia crónica e insomnio familiar letal), parálisis bulbar, enfermedad de la motoneurona y trastornos heterodegenerativos del sistema nervioso (incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis ceroide neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del cabello ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden-Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch-Nyhan y síndrome de Unverricht-Lundborg), demencia (incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de Pick y ataxia espinocerebelosa), cáncer (p. ej., del SNC y/o el cerebro, incluyendo las metástasis cerebrales resultantes de cáncer en otras partes del cuerpo).

Un "fármaco para trastornos neurológicos" es un fármaco o agente terapéutico que trata uno o más trastornos neurológicos. Los fármacos para trastornos neurológicos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, péptidos, proteínas, ligandos naturales de una o más dianas del SNC, versiones modificadas de ligandos naturales de una o más dianas del SNC, aptámeros, ácidos nucleicos inhibidores (es decir, ARN inhibidores pequeños (ARNip) y ARN de horquilla corta (ARNhc)), ribozimas y moléculas pequeñas, o fragmentos activos de cualquiera de los anteriores. Se describen ejemplos de fármacos para trastornos neurológicos de la invención en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos, aptámeros, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos inhibidores y moléculas pequeñas y fragmentos activos de cualquiera de los anteriores que son por sí mismos o reconocen específicamente y/o actúan sobre (es decir, inhiben, activan o detectan) un antígeno o molécula diana del SNC tales como, pero no limitado

a, proteína precursora amiloide o partes de la misma, beta amiloide, beta-secretasa, gamma-secretasa, tau, alfa-sinucleína, parkina, huntingtina, DR6, presenilina, ApoE, glioma u otros marcadores de cáncer del SNC y neurotrofinas. Se proporcionan ejemplos no limitantes de fármacos para trastornos neurológicos y los trastornos en los que se pueden usar como tratamiento en la siguiente tabla 1:

5

TABLA 1: Ejemplos no limitantes de fármacos para trastornos neurológicos y los trastornos correspondientes en los que se pueden usar como tratamiento

Fármaco	Trastorno neurológico
Anticuerpo anti-BACE1	Enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral aguda y crónica, apoplejía
Anticuerpo anti-Abeta	Enfermedad de Alzheimer
Neurotrofina	Apoplejía, lesión cerebral aguda, lesión de la médula espinal
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2)	Lesión cerebral crónica (neurogénesis)
Anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	Cáncer de cerebro
Factor neural derivado de la línea celular glial (GDNF)	Enfermedad de Parkinson
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	Esclerosis lateral amiotrófica, depresión
Enzima lisosómica	Trastornos de almacenamiento lisosómico del cerebro
Factor neurotrófico ciliar (CNTF)	Esclerosis lateral amiotrófica
Neuregulina 1	Esquizofrenia
Anticuerpo anti-HER2 (p. ej., trastuzumab)	Metástasis cerebral de cáncer HER2-positivo

10 Un "agente para la formación de imágenes" es un compuesto que tiene una o más propiedades que permiten detectar directa o indirectamente su presencia y/o ubicación. Ejemplos de dichos agentes de formación de imágenes incluyen proteínas y compuestos de molécula pequeña que incorporan un resto marcado que permite la detección.

15 Un "antígeno del SNC" o "antígeno cerebral" es un antígeno expresado en el SNC, incluyendo el cerebro, que puede estar dirigido con un anticuerpo o una molécula pequeña. Los ejemplos de dichos antígenos incluyen, sin limitación: beta-secretasa 1 (BACE1), beta amiloide (Abeta), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6. En un modo de realización, el antígeno es BACE1.

20 El término "BACE1," como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier beta-secretasa 1 nativa (también llamada enzima 1 de escisión de la proteína precursora amiloide en el sitio β , proteasa aspártica 2 asociada a membrana, memapsina 2, aspartil proteasa 2 o Asp2) de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como primates (p. ej., seres humanos) y roedores (p. ej., ratones y ratas), a menos se indique de otro modo. El término abarca BACE1 no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de BACE1 que resulta del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de BACE1, p. ej., variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de BACE1 de ejemplo es la secuencia para BACE1 humana, isoforma A como se informa en Vassar *et al.*, *Science* 286:735-741 (1999). Existen otras varias isoformas de BACE1 humana, incluyendo las isoformas B, C y D. Véase UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817.

30 Los términos "anticuerpo anti-beta-secretasa", "anticuerpo anti-BACE1", "un anticuerpo que se une a beta-secretasa" y "un anticuerpo que se une a BACE1" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a BACE1 con una afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico dirigido a BACE1. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-BACE1 a una proteína no relacionada que no es BACE1, es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a BACE1 medida, p. ej., mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertos modos de realización, un anticuerpo que se une a BACE1 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (p. ej., 10^{-8} M o menos, p. ej. de 10^{-8} M hasta 10^{-13} M , p. ej., de 10^{-9} M hasta 10^{-13} M). En ciertos modos de realización, un anticuerpo anti-BACE1 se une a un epítipo de BACE1 que se conserva en BACE1 de diferentes especies e isoformas. En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo que se une al epítipo en BACE1 unido por el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31. En otros modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un exosítio dentro de BACE1 situado en el dominio catalítico de BACE1. En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo que compite con los péptidos identificados en Kornacker *et al.*, *Biochem.* 44:11567-11573 (2005), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad (es decir, los péptidos 1, 2, 3, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-12, 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 4, 5, 6, 5-10, 5-9, desordenados, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A y L11A) por la unión a BACE1. Ejemplos de secuencias de anticuerpos BACE1 se representan en las figuras 5A-B y las figuras 6A-B. Un anticuerpo a modo de

45

ejemplo en el presente documento comprende los dominios variables del anticuerpo YW412.8.31 (p. ej., como en las figuras 5A-B).

Una proteína con "secuencia nativa" en el presente documento se refiere a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína encontrada en la naturaleza, incluyendo variantes naturales de la proteína. El término, como se usa en el presente documento, incluye la proteína aislada de una fuente natural de la misma, o producida de forma recombinante.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

Los "fragmentos de anticuerpo" en el presente documento comprenden una parte de un anticuerpo intacto que conserva la capacidad de unirse al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

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 comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, a excepción de posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes dichas variantes, en general, en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos al no estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como requiriendo la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usarse de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por el procedimiento de hibridoma descrito inicialmente por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo. Los ejemplos específicos de anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., mono del viejo mundo, tales como babuino, macaco de la India o macaco cangrejero) y secuencias de regiones constantes humanas (patente de EE. UU. n.º 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tales como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, a excepción de la(s) sustitución(es) de FR señaladas anteriormente. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo humano" en el presente documento es uno que comprende una estructura de secuencia de aminoácidos que se corresponde con la estructura de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo obtenible a partir de un linfocito B humano, e incluye fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos se pueden

identificar o preparar por una variedad de técnicas incluyendo, pero no limitado a: producción de animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas (véase, p. ej., Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y patentes de EE. UU. n.º 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807); selección de bibliotecas de presentación en fagos que expresan anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990); Johnson *et al.*, *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993); Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991); Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993); patentes de EE. UU. n.º 5.565.332 y 5.573.905); generación a través de linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.567.610 y 5.229.275); y aislamiento a partir de hibridomas que producen anticuerpos humanos.

Un "anticuerpo multiespecífico" en el presente documento es un anticuerpo que tiene especificidades de unión por al menos dos epítomos diferentes. Los anticuerpos multiespecíficos de ejemplo se pueden unir tanto a un R-BHE como a un antígeno cerebral. Los anticuerpos multiespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (p. ej., anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). También se contemplan anticuerpos diseñados con dos, tres o más (p. ej., cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (véase, p. ej., la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2002/0004587 A1, Miller *et al.*). Los anticuerpos multiespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos del presente documento incluyen "variantes de secuencia de aminoácidos" con la unión al antígeno o la actividad biológica alterada. Los ejemplos de dichas alteraciones de aminoácidos incluyen anticuerpos con afinidad potenciada por el antígeno (p. ej., anticuerpos de "afinidad madurada") y anticuerpos con la región Fc alterada, si está presente, p. ej., con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (aumentada o disminuida) (véase, p. ej., el documento WO 00/42072, Presta, L. y el documento WO 99/51642, Iduosogie *et al.*); y/o semivida en suero aumentada y/o disminuida (véase, p. ej., el documento WO 00/42072, Presta, L.).

Una "variante de afinidad modificada" tiene uno o más restos sustituidos en las regiones hipervariables o marco de un anticuerpo precursor (p. ej., de un anticuerpo precursor quimérico, humanizado o humano) que alteran (aumentan o reducen) la afinidad. En un modo de realización, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para desarrollo adicional tendrá(n) afinidad reducida por el R-BHE de acuerdo con la presente invención. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución usa la presentación en fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (p. ej., 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se criban entonces por su actividad biológica (p. ej., afinidad de unión). Para identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para su modificación, se puede realizar una mutagénesis de barrido de alanina para identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. De forma alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y su diana. Dichos restos de contacto y los restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado y los anticuerpos con afinidad alterada se pueden seleccionar para un mayor desarrollo.

El anticuerpo del presente documento se puede conjugar con una "molécula heteróloga", por ejemplo, para aumentar la semivida o la estabilidad o para mejorar de otra manera el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede ligar a uno de la variedad de polímeros no proteicos, p. ej., polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Los fragmentos de anticuerpo, tales como Fab', ligados a una o más moléculas de PEG, son un modo de realización ejemplar de la invención.

El anticuerpo del presente documento puede ser una "variante de glucosilación" de tal manera que cualquier carbohidrato unido a la región Fc, si está presente, se altera. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se mencionan anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) divisora en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y en la patente de E. UU. n.º 6.602.684, Umana *et al.* Se informa de anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Véase también el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) que se refieren a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*) que describe anticuerpos con glucosilación modificada.

El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (p. ej., los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (p. ej., los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los restos "marco" o "FR" son los restos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

Un "anticuerpo de longitud completa" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (p. ej., dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no está conjugado a una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico, polímero o radiomarcador.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la unión al receptor Fc, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), etc. En un modo de realización, el anticuerpo del presente documento carece esencialmente de función efectora.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa se pueden asignar a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos de longitud completa: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas se pueden dividir, además, en "subclases" (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o fragmento de unión a antígeno del mismo) que se expresa por una célula huésped recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Los ejemplos de "células huésped" para producir anticuerpos recombinantes incluyen: (1) células de mamífero, por ejemplo, de ovario de hámster chino (CHO), COS, células de mieloma (incluyendo células Y0 y NS0), de riñón de cría de hámster, células HeLa y Vero (BHK); (2) células de insecto, por ejemplo, sf9, sf21 y Tn5; (3) células de plantas, por ejemplo, plantas que pertenecen al género *Nicotiana* (p. ej. *Nicotiana tabacum*); (4) células de levadura, por ejemplo, las que pertenecen al género *Saccharomyces* (p. ej. *Saccharomyces cerevisiae*) o al género *Aspergillus* (p. ej., *Aspergillus niger*); (5) células bacterianas, por ejemplo, células de *Escherichia coli* o células de *Bacillus subtilis*, etc.

Como se usa en el presente documento, "se une específicamente" o "se une específicamente a" se refiere a un anticuerpo que se une selectiva o preferentemente 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 (p. ej., usando BIACORE®).

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más. En un modo de realización, un anticuerpo anti-BACE1 se une al epítipo BACE1 unido por YW412.8.31.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide una función celular y/o provoca muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos (p. ej., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² y los isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos.

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

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una parte de la región constante. El término incluye las regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácido en la región Fc o la región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, también llamado el índice de la UE, como se describe en Kabat *et al.*,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Marco" o "FR" se refiere a restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable (HVR). El 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, en general, aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas incluyendo, pero no limitado a, un marcador o un agente citotóxico. Opcionalmente, dicha conjugación es a través de un engarce.

Un "engarce", como se usa en el presente documento, es una estructura que conecta covalentemente o no covalentemente el anticuerpo anti-R-BHE a una molécula heteróloga. En ciertos modos de realización, un engarce es un péptido. En otros modos de realización, un engarce es un engarce químico.

Un "marcador" es un marcador acoplado al anticuerpo del presente documento y se usa para la detección o la formación de imágenes. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen: un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo o una marca de afinidad. En un modo de realización, el marcador es un radiomarcador usado para la formación de imágenes médicas, por ejemplo, Tc99m o I123, o un marcador de espín para la formación de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, IRM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso, hierro, etc.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (p. ej., vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (p. ej., seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (p. ej., ratones y ratas). En ciertos 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, un anticuerpo se purifica hasta más de un 95 % o 99 % de pureza determinada por, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoelectrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (p. ej., intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una recapitulación de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

El término "prospecto" se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, tratamiento de combinación, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en el mismo para ser eficaz, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, que no sea 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 "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o durante el curso de una 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 la metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

II. COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

II. Producción de anticuerpos anti-R-BHE y conjugados de los mismos

Los procedimientos y artículos de fabricación de la presente invención usan, o incorporan, un anticuerpo que se une al R-BHE. El antígeno R-BHE que se usa para la producción, o la detección, de anticuerpos puede ser, p. ej., una forma soluble o una parte del mismo (p. ej., el dominio extracelular), que contiene el epítipo deseado. De forma alternativa, o adicionalmente, las células que expresan R-BHE en su superficie celular se pueden usar para generar, o detectar, anticuerpos. Otras formas de R-BHE útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica. Los ejemplos de R-BHE en el presente documento incluyen el receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF-I), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y LRP8, etc., y factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF).

De acuerdo con la presente invención, un anticuerpo anti-R-BHE de "baja afinidad" (por ejemplo, anti-TfR) se selecciona basándose en los datos del presente documento que demuestran que dichos anticuerpos presentan una captación mejorada en el SNC (por ejemplo, en el cerebro). Para identificar dichos anticuerpos de baja afinidad, están disponibles diversos ensayos para medir la afinidad de los anticuerpos, incluyendo, sin limitación: ensayo de Scatchard y técnica de resonancia de plasmón superficial (p. ej., usando BIACORE®). De acuerdo con un modo de realización de la invención, el anticuerpo tiene una afinidad por el antígeno R-BHE (p. ej., por TfR) de aproximadamente 5 nM, o de aproximadamente 20 nM, o de aproximadamente 100 nM, a aproximadamente 10 µM, o a aproximadamente 1 µM, o a aproximadamente 500 nM. Por lo tanto, la afinidad puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 mM, o en el intervalo de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 1 µM, o en el intervalo de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM, por ejemplo, medida por análisis de Scatchard o BIACORE®.

Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo útil para el transporte de un fármaco para trastornos neurológicos a través de la barrera hematoencefálica que comprende la selección de un anticuerpo de un panel de anticuerpos contra un receptor de la barrera hematoencefálica (R-BHE), ya que tiene una afinidad por el R-BHE que está en el intervalo de aproximadamente 5 nM, o de aproximadamente 20 nM, o de aproximadamente 100 nM, a aproximadamente 10 µM, o a aproximadamente 1 µM, o a aproximadamente 500 mM. Por lo tanto, la afinidad puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 mM, o en el intervalo de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 1 µM, o en el intervalo de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM, por ejemplo, medida por análisis de Scatchard o BIACORE®. Como comprenderá un experto en la técnica, la conjugación de una molécula/compuesto heterólogo con un anticuerpo a menudo disminuirá la afinidad del anticuerpo por su diana debido, por ejemplo, al impedimento estérico o incluso a la eliminación de un brazo de unión si el anticuerpo se ha preparado multiespecífico con uno o más brazos de unión a un antígeno diferente a la diana original del anticuerpo. En un modo de realización, un anticuerpo de baja afinidad de la invención específico para TfR conjugado con BACE1 tenía una Kd para TfR medida por BIACORE de aproximadamente 30 nM. En otro modo de realización, un anticuerpo de baja afinidad de la invención específico para TfR conjugado con BACE1 tenía una Kd para TfR medida por BIACORE de aproximadamente 600 nM.

Un ensayo de ejemplo para evaluar la afinidad del anticuerpo es por análisis de Scatchard. Por ejemplo, el anticuerpo anti-R-BHE de interés se puede yodar usando el procedimiento de lactoperoxidasa (Bennett y Horuk, *Methods in Enzymology* 288 pág. 134-148 (1997)). Un anticuerpo anti-R-BHE radiomarcado se purifica de 125I-Na libre por filtración en gel usando una columna NAP-5 y se mide su actividad específica. Las mezclas de reacción de competición de 50 µl que contienen una concentración fija de anticuerpo yodado y concentraciones decrecientes de anticuerpo no marcado diluido en serie se colocan en placas de 96 pocillos. Las células que expresan transitoriamente R-BHE se cultivan en un medio de crecimiento, que consiste en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Genentech) suplementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM y 1 × penicilina-estreptomicina a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se desprenden de las placas usando solución de disociación Sigma Cell y se lavan con tampón de unión (DMEM con seroalbúmina bovina al 1 %, HEPES 50 mM, pH 7,2 y azida sódica al 0,2 %). Las células lavadas se añaden en una densidad aproximada de 200.000 células en 0,2 ml de tampón de unión a las placas de 96-pocillos que contienen las mezclas de reacción de competición de 50-µl. La concentración final del anticuerpo no marcado en la reacción de competición con células se varía, empezando en 1000 nM y luego disminuyendo en un factor de dilución 1:2 para 10 concentraciones e incluyendo una muestra de tampón únicamente sin nada añadido. Las reacciones de competición con células para cada concentración de anticuerpo no marcado se ensayan por triplicado. Las reacciones de competición con células se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de las 2 horas de incubación, las reacciones de competición se transfieren a una placa de filtro y se lavan cuatro veces con tampón de unión para separar el anticuerpo libre del anticuerpo yodado unido. Los filtros se cuentan con un contador gamma y los datos de unión se evalúan usando el algoritmo de ajuste de Munson y Rodbard (1980) para determinar la afinidad de unión del anticuerpo.

Un análisis de Scatchard de ejemplo que usa las composiciones de la invención se puede realizar como sigue. Se yodó anti-TfR^A por el procedimiento de lactoperoxidasa (Bennett y Horuk, *Methods in Enzymology* 288 pág. 134-148 (1997)). El anti-TfRA radiomarcado se purificó de 125I-Na libre por filtración en gel usando una columna NAP-5; el anti-TfRA purificado tenía una actividad específica de 19,82 µCi/µg. Las mezclas de reacción de competición de 50 µl que contenían una concentración fija de anticuerpo yodado y concentraciones decrecientes de anticuerpo no marcado diluido en serie se colocaron en placas de 96 pocillos. Las células 293 que expresan transitoriamente TfR murino se cultivaron en un medio de crecimiento, que consistía en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Genentech) suplementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM y 1 × penicilina-estreptomicina a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se separaron de las placas usando solución de disociación Sigma Cell y se lavaron con tampón de unión (DMEM con seroalbúmina bovina al 1 %, HEPES 50 mM, pH 7,2 y azida sódica al 0,2 %). Las células lavadas se añadieron en una densidad aproximada de 200.000 células en 0,2 ml de tampón de unión a las placas de 96-pocillos que contenían las mezclas de reacción de competición de 50-µl. La concentración final del anticuerpo yodado en cada reacción de competición con células fue de 100 pM (134.000 cpm por 0,25 ml). La concentración final del anticuerpo no marcado en la reacción de competición con células se varió, empezando en 1000 nM y luego disminuyendo en un factor de dilución 1:2 para 10 concentraciones e incluyendo una muestra de tampón únicamente sin nada añadido. Las reacciones de competición con células para cada concentración de anticuerpo no marcado se ensayaron por triplicado. Las reacciones de competición con células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de las

2 horas de incubación, las reacciones de competición se transfirieron a una placa de filtro Millipore Multiscreen y se lavaron cuatro veces con tampón de unión para separar el anticuerpo libre del anticuerpo yodado unido. Los filtros se contaron en un contador gamma Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences; Waltham, MA). Los datos de unión se evaluaron usando el programa informático New Ligand (Genentech), que usa el algoritmo de ajuste de Munson y Rodbard (1980) para determinar la afinidad de unión del anticuerpo.

Un análisis de BIACORE® de ejemplo que usa las composiciones de la invención se puede realizar como sigue. La Kd se midió usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C usando el kit de anti-Fc humano (BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Brevemente, los chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activaron con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El anticuerpo anti-Fc humano se diluyó con acetato de sodio 10 mM, pH 4,0, a 50 µg/ml antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10.000 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del anticuerpo, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no habían reaccionado. Para las mediciones de cinética, las variantes de anticuerpo anti-TfR se inyectaron en HBS-P hasta alcanzar aproximadamente 220 UR; a continuación, se inyectaron diluciones en serie 1:2 de MuTfR-His (0,61 nM a 157 nM) en HBS-P a 25 °C a un caudal de aproximadamente 30 µl/min. Las tasas de asociación (kon) y las tasas de disociación (koff) se calcularon usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIACORE® versión 3.2) por ajuste de forma simultánea de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)

De acuerdo con otro modo de realización, la Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial con un dispositivo BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C usando el kit de anti-Fc humano (BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Brevemente, los chips de biosensores 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 anticuerpo anti-Fc humano se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,0, a 50 µg/ml antes de la inyección a una caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10.000 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del anticuerpo, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, las variantes de anticuerpo anti-R-BHE se inyectan en HBS-P hasta alcanzar aproximadamente de 220 UR; a continuación, se inyectan diluciones en serie 1:2 de R-BHE-His (0,61 nM a 157 nM) en HBS-P a 25 °C a una caudal de aproximadamente 30 µl/min. Las tasas de asociación (kon) y las tasas de disociación (koff) se calculan usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIACORE® versión 3.2) por ajuste de forma simultánea de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999).

Una medición sustitutiva de la afinidad de uno o más anticuerpos contra R-BHE es su concentración inhibidora máxima media (CI50), una medida de la cantidad de anticuerpo que se necesita para inhibir la unión de un ligando R-BHE conocido al R-BHE en un 50 %. Varios procedimientos de determinación de la CI50 para un compuesto dado son conocidos en la técnica; una estrategia común es realizar un ensayo de unión competitiva, tal como el descrito en el presente documento en los ejemplos, es decir, con respecto a la figura 2A. En general, una CI50 alta indica que se requiere más cantidad del anticuerpo para inhibir la unión del ligando conocido y, por lo tanto, que la afinidad del anticuerpo por ese ligando es relativamente baja. Por el contrario, una CI50 baja indica que se requiere menos cantidad del anticuerpo para inhibir la unión del ligando conocido y, por lo tanto, que la afinidad del anticuerpo por ese ligando es relativamente alta.

Un ensayo ELISA competitivo a modo de ejemplo para medir la CI50 es uno en el que se usan concentraciones crecientes de anticuerpos variantes anti-TfR o anti-TfR/antígeno cerebral (es decir, anti-TfR/BACE1, anti-TfR/Abeta y similares) para competir contra TfR^A biotinilado por la unión a TfR. El ELISA de competición anti-TfR se realizó en placas Maxisorp (Neptuno, N.J.) recubiertas con 2,5 µg/ml de dominio extracelular TfR murino purificado en PBS a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Una valoración de cada anti-TfR o anti-TfR/antígeno cerebral individual (es decir, anti-TfR/BACE1 o anti-TfR/Abeta) (dilución en serie 1:3) se combinó con anti-TfR^A biotinilado (concentración final 0,5 nM) y se añadió a la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con Tween 20 al 0,05 % en PBS, se añadió HRP-estreptavidina (Southern Biotech, Birmingham) a la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con Tween 20 al 0,05 % en PBS, y se detectó el anti-TfR^A biotinilado unido a la placa usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

En un modo de realización, el anticuerpo anti-R-BHE de baja afinidad del presente documento se acopla con un marcador y/o fármaco para trastornos neurológicos o agente para la formación de imágenes para transportar de manera más eficaz el marcador y/o fármaco o agente para la formación de imágenes a través de la BHE. Dicho acoplamiento se puede conseguir por reticulantes químicos o generando proteínas de fusión, etc.

La conjugación covalente puede ser directa o a través de un engarce. En ciertos modos de realización, la conjugación directa es por construcción de una proteína de fusión (es decir, por fusión genética de los dos genes que codifican el anticuerpo contra R-BHE y el fármaco para trastornos neurológicos y su expresión como una única proteína). En ciertos

modos de realización, la conjugación directa se realiza por la formación de un enlace covalente entre un grupo reactivo de una de las dos partes del anticuerpo anti-R-BHE y un grupo correspondiente o aceptor del fármaco neurológico. En ciertos modos de realización, la conjugación directa se realiza por modificación (es decir, modificación genética) de una de las dos moléculas 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 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 resto de cisteína) se puede introducir en, por ejemplo, el anticuerpo anti-R-BHE y formar un enlace disulfuro con el fármaco neurológico. Los procedimientos para la conjugación covalente de los ácidos nucleicos a las proteínas también se conocen en la técnica (es decir, fotorreticulación, véase, por ejemplo, Zetsepín *et al. Russ. Chem. Rev.* 74: 77-95 (2005)). La conjugación no covalente puede ser por cualquier medio de unión no covalente, incluyendo enlaces hidrófobos, enlaces iónicos, interacciones electrostáticas y similares, como comprenderá fácilmente un experto en la técnica. La conjugación también se puede realizar usando una variedad de engarces. Por ejemplo, un anticuerpo anti-R-BHE y un fármaco neurológico se pueden conjugar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (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 bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). También se pueden usar engarces peptídicos, que comprenden de uno a veinte aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En ciertos de dichos modos de realización, los aminoácidos se seleccionan de los veinte aminoácidos de origen natural. En otros de dichos modos de realización, uno o más de los aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. El engarce puede ser un "engarce escindible" que facilita la liberación del fármaco neurológico después de la entrega al cerebro. Por ejemplo, se puede usar un engarce lábil en medio ácido, engarce sensible a peptidasa, engarce fotolábil, engarce de dimetilo o engarce que contiene disulfuro (Chari *et al., Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

La invención del presente documento contempla expresamente, pero no se limita a, conjugados preparados con reactivos reticulantes, incluyendo, pero no limitado a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

Para un trastorno neuropático, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un analgésico incluyendo, pero no limitado a, un analgésico opioide/narcótico (es decir, morfina, fentanilo, hidrocodona, meperidina, metadona, oximorfona, pentazocina, propoxifeno, tramadol, codeína y oxicodona), un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) (por ejemplo, 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 antimigraña (es decir, sumatriptina, almotriptano, frovatriptano, sumatriptano, rizatriptano, eletriptano, zolmitriptano, dihidroergotamina, eletriptano y ergotamina), acetaminofeno, un salicilato (es decir, ácido acetilsalicílico, salicilato de colina, salicilato de magnesio, diflunisal y salsalato), un anticonvulsivo (es decir, carbamazepina, clonazepam, gabapentina, lamotrigina, pregabalina, tiagabina y topiramato), un anestésico (es decir, isoflurano, tricloroetileno, halotano, sevoflurano, benzocaína, cloroprocaina, cocaína, ciclotetacaína, dimetocaína, propoxicaína, procaína, novocaína, proparacaína, tetracaína, artacaína, bupivacaína, cartacaína, 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 la participación de vértigo, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente antivértigo, incluyendo, pero no limitado a, meclizina, difenhidramina, prometazina y diazepam. Para un trastorno neuropático con la participación de náuseas, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente antiemético, incluyendo, pero no limitado a, prometazina, clorpromazina, proclorperazina, trimetobenzamida y metoclopramida. Para una enfermedad neurodegenerativa, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es una hormona del crecimiento o factor neurotrófico; los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el factor neurotrófico 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 transformante (TGF)-alfa, TGF-beta, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), neurturina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, neuregulina, artemina, persefina, interleucinas, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GFR), factor estimulante de colonias de granulocitos (CSF), CSF de granulocitos y macrófagos, netrinas, cardiotrofina-1, hedgehog, factor inhibidor de leucemia (LIF), midquina, pleiotrofina, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), netrinas, saposinas, semaforinas y factor de células madre (SCF).

Para el cáncer, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida 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, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-

tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; 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 (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; esponjistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y calicheamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina cromoproteicos relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterinina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; antipararrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), Cremophor libre ABRAXANETM, formulación de nanopartículas modificadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel 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 como CHOP, una abreviatura para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) en combinación con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición de agentes quimioterapéuticos los agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y que están a menudo en forma de tratamiento sistémico o de todo el organismo. Pueden ser hormonas por sí mismos. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores 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 suprimiendo o paralizando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida UPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-midazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIL, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos como el 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 troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano nucleosídico de citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); vacunas tales como vacunas THERATOPE® y vacunas de tratamiento génico, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina cinasa doble 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 la prevención del cáncer son inmunoglobulinas antineoplásicas (incluyendo, pero no limitado a, trastuzumab, bevacizumab, alemtuxumab, cetuximab, gemtuzumab, ozogamicina, ibritumomab, tiuxetan, panitumumab y rituximab). En algunos casos, se pueden usar anticuerpos en conjunción con un marcador tóxico para atacar y destruir las células deseadas (es decir, células cancerosas) incluyendo, pero no limitado a, tositumomab con un radiomarcador ¹³¹I.

Para una enfermedad o trastorno ocular, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente oftálmico antiangiogénico (es decir, bevacizumab, ranibizumab y pegaptanib), un agente oftálmico para glaucoma (es decir, carbacol, epinefrina, bromuro de demecario, apraclonidina, brimonidina, brinzolamida, levobunolol, timolol, betaxolol, dorzolamida, bimatoprost, carteolol, metipranolol, dipivefrina, travoprost y latanoprost), un inhibidor de 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, triamcinolona y medrisona), un anestésico oftálmico (es decir, lidocaína, proparacaína y tetracaína), un antiinfeccioso oftálmico (es decir, levofloxacina, gatifloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina, cloranfenicol, bacitracina/polimixina B, sulfacetamida, tobramicina, azitromicina, besifloxacina, norfloxacina, sulfisoxazol, gentamicina, idoxuridina, eritromicina, natamicina, gramicidina, neomicina, ofloxacina, trifluridina, ganciclovir, vidarabina), un agente antiinflamatorio oftálmico (es decir, nepafenaco, ketorolaco, flurbiprofeno, suprofenol, 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).

Para un trastorno convulsivo, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un anticonvulsivo o antiepiléptico incluyendo, pero no limitado a, anticonvulsivos barbitúricos (es decir, primidona, metarbital, mefobarbital, alobarbital, amobarbital, aprobarbital, alfenal, barbital, bralobarbital y fenobarbital), anticonvulsivos de benzodiazepinas (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 de dibenzazepina (es decir, rufinamida, carbamazepina y oxcarbazepina), anticonvulsivos derivados de ácidos grasos (es decir, divalproex y ácido valproico), análogos del 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, vigabatrina), anticonvulsivos de hidantoína (es decir, fenitoína, etotoína, fosfenitoína y mefenitoína), anticonvulsivos diversos (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 (es decir, etosuximida y metosuximida), anticonvulsivos de triazina (es decir, lamotrigina) y anticonvulsivos de urea (es decir, fenacemida y feneturida).

Para una enfermedad de almacenamiento lisosómico, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es en sí mismo o imita de otra manera la actividad de la enzima que está alterada en la enfermedad. Los ejemplos de enzimas recombinantes para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico incluyen, pero no se limitan a los expuestos en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0142141 (es decir, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-sulfatasa, alfa-N-acetilglucosaminidasa, N-acetil-galactosamina-6-sulfatasa, beta-galactosidasa, arilsulfatasa B, beta-glucuronidasa, ácido alfa-glucosidasa, glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida, beta-galactocerebrosidasa, beta-galactosidasa, arilsulfatasa A, ceramidasa ácida, aspartoacilasa, palmitoil-proteína tioesterasa 1 y tripeptidil amino peptidasa 1).

Para la amiloidosis, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo u otra molécula de unión (incluyendo, pero no limitado a, una molécula pequeña, un péptido, un aptámero u otro aglutinante de proteína) que se une específicamente a una diana seleccionada de: beta-secretasa, tau, presenilina, proteína precursora de amiloide o partes de la misma, péptido beta amiloide u oligómeros o fibrillas de los mismos, receptor 6 de muerte (DR6), receptor de productos finales de glucación avanzada (RAGE), parkina y huntingtina; un inhibidor de colinesterasa (es decir, galantamina, donepezilo, rivastigmina y tacrina); un antagonista del receptor de NMDA (es decir, memantina), un reductor de monoamina (es decir, tetrabenazina); un mesilato ergoloide; un agente anticolinérgico antiparkinsoniano (es decir, prociclidina, difenhidramina, trihexifenidilo, benzotropina, biperideno y trihexifenidilo); un agente dopaminérgico antiparkinsoniano (es decir, entacapona, selegilina, pramipexol, bromocriptina, rotigotina, selegilina, ropinirol, rasagilina, apomorfina, carbidopa, levodopa, pergolida, tolcapona y amantadina); una tetrabenazina; un antiinflamatorio (incluyendo, pero no limitado a, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (es decir, indometicina y otros compuestos mencionados anteriormente); una hormona (es decir, estrógeno, progesterona y leuprolida), una vitamina (es decir, folato y nicotinamida); una dimebolina; una homotaurina (es decir, ácido 3-aminopropansulfónico; 3APS); un modulador de la actividad del receptor de serotonina (es decir, xaliprodeno); un interferón y un glucocorticoide.

Para una enfermedad vírica o microbiana, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluye, pero no se limita a, un compuesto antivírico (incluyendo, pero no limitado a, un antivírico de adamantano (es decir, rimantadina y amantadina), un interferón antivírico (es decir, peginterferón alfa-2b), un antagonista de los receptores de quimiocinas (es decir, maraviroc), un inhibidor de transferencia de la cadena de la integrasa (es decir, raltegravir), un inhibidor de neuraminidasa (es decir, osetamivir y zanamivir), un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa (es decir, efavirenz, etravirina, delavirdina y nevirapina), un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa (tenofovir, abacavir,

lamivudina, zidovudina, estavudina, entecavir, emtricitabina, adefovir, zalcitabina, telbivudina y didanosina), un inhibidor de proteasa (es decir, darunavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, indinavir y saquinavir), un nucleósido de purina (es decir, valaciclovir, famciclovir, aciclovir, ribavirina, ganciclovir, valganciclovir y cidofovir), y un antivírico variado (es decir, enfuvirtida, foscarnet, palivizumab y fomivirsen), un antibiótico (incluyendo, pero no limitado a, una aminopenicilina (es decir, amoxicilina, ampicilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, temocilina, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina y bacampicilina), una cefalosporina (es decir, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefamandol, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, cefadroxilo, cefradina, loracarbef, cefotetán, cefuroxima, cefprozil, cefaclor y ceftoxitina), un carbapenem/penem (es decir, imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem y doripenem), una monobactama (es decir, aztreonam, tigemonam, norcardicina A y tabtoxinina-beta-lactama), un inhibidor de beta-lactamasa (es decir, ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam) en combinación con otro antibiótico beta-lactámico, 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), a glucopéptido (es decir, teicoplanina y vancomicina), un macrólido (es decir, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espectinomina), una monobactama (es decir, aztreonam), una quinolona (es decir, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, grepafloxacina, esparfloxacina y temafloxacina), una sulfonamida (es decir, mafenida, sulfonamidocrisodina, 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, daunorubicina, dactinomina, epirubicina, idarubicina, 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, iodoquinol y paromomicina) y un antiparasitario (incluyendo, pero no limitado a, quinina, cloroquina, amodiaquina, pirimetamina, sulfadoxina, proguanil, mefloquina, atovacuona, primaquina, artemisinina, halofantrina, doxiciclina, clindamicina, mebendazol, pamoato de pirantel, tiabendazol, dietilcarbamazina, ivermectina, rifampicina, anfotericina B, melarsoprol, efortinitina y albendazol).

Para isquemia, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluye, pero no se limita a, un trombolítico (es decir, urocinasa, alteplasa, reteplasa y tenecteplasa), un inhibidor de la agregación de las plaquetas (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 el flujo sanguíneo o la flexibilidad vascular, incluyendo, por ejemplo, medicamentos para la presión arterial.

Para un trastorno del comportamiento, se puede seleccionar un fármaco neurológico de un compuesto modificador del comportamiento incluyendo, pero no limitado a, un antipsicótico atípico (es decir, risperidona, olanzapina, apripiprazol, 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 benzodiazepina (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, modafinilo, pemolina, fendimetrazina, benzfetamina, fendimetrazina, armodafinil, dietilpropión, cafeína, atomoxetina, doxapram y mazindol), un ansiolítico/sedante/hipnótico (incluyendo, pero no limitado a, un barbitúrico (es decir, secobarbital, fenobarbital y mefobarbital), una benzodiazepina (como se describe anteriormente) y un ansiolítico/sedante/hipnótico variado (es decir, difenhidramina, oxibato de sodio, zaleplón, hidroxizina, cloral hidrato, aolpidem, buspirona, doxepina, eszopiclona, ramelteon, meprobamato y etclorvinol), una secretina (véase, por ejemplo, Ratliff-Schaub *et al. Autism* 9: 256-265 (2005)), un péptido opioide (véase, por ejemplo, Cowen *et al., J. Neurochem.* 89:273-285 (2004)) y un neuropéptido (véase, por ejemplo, Hethwa *et al. Am. J. Physiol.* 289: E301-305 (2005)).

Para la inflamación del SNC, se puede seleccionar un fármaco neurológico que aborda la inflamación en sí misma (es decir, un agente antiinflamatorio no esteroideo como ibuprofeno o naproxeno), o uno que trata la causa subyacente de la inflamación (es decir, un agente antivírico o antineoplásico).

De acuerdo con un modo de realización de la invención, el "acoplamiento" se logra generando un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico). Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al R-BHE y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral, tal como beta-secretasa 1 (BACE1) o Abeta, y otros antígenos cerebrales divulgados en el presente documento.

Un ejemplo de antígeno cerebral unido por dicho anticuerpo multiespecífico/biespecífico es BACE1, y un ejemplo de anticuerpo de unión al mismo es el anticuerpo YW412.8.31 de las figuras 5a-b del presente documento.

En otro modo de realización, el antígeno cerebral es Abeta, se describen ejemplos de dichos anticuerpos en los documentos WO2007068412, WO2008011348, WO20080156622 y WO2008156621, comprendiendo un anticuerpo contra Abeta de ejemplo el anticuerpo IgG4 MABT5102A que comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de las figuras 7a y 7b, respectivamente.

Las técnicas para generar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y la tecnología de "botón en ojal" (knob-in-hole) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden preparar mediante modificando los efectos de orientación por interacción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (documento WO 2009/089004A1); reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science*, 229.: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpo" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros Fv (sFv) de cadena única (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos modificados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo "anticuerpos pulpo" o "inmunoglobulinas de dominio de dos variables" (DVD) también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1 y Wu *et al.* *Nature Biotechnology* (2007)).

El anticuerpo o fragmento del presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une al R-BHE (por ejemplo, TfR), así como al antígeno cerebral (por ejemplo, BACE1) (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

En un modo de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, estando divulgados anteriormente varios de dichos fragmentos.

En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo intacto o de longitud completa. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. En un modo de realización, el anticuerpo intacto carece de función efectora.

Las técnicas para la generación de anticuerpos son conocidas y se proporcionan ejemplos anteriormente en la sección de definiciones del presente documento. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Varias técnicas están disponibles para determinar la unión del anticuerpo al R-BHE. Uno de dichos ensayos es un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) para confirmar la capacidad de unión al R-BHE humano (y al antígeno cerebral). De acuerdo con este ensayo, las placas recubiertas con antígeno (por ejemplo, R-BHE recombinante) se incuban con una muestra que comprende el anticuerpo anti-R-BHE y se determina la unión del anticuerpo al antígeno de interés.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, por procedimientos conocidos tales como ELISA, bandas de Western, etc.

Los ensayos para evaluar la captación del anticuerpo administrado sistémicamente y otra actividad biológica del anticuerpo se pueden realizar como se divulga en los ejemplos o como es conocido para el anticuerpo anti-antígeno cerebral de interés.

Los ejemplos de ensayos en los que el anticuerpo multiespecífico se une a BACE1 se describirán ahora.

Los ensayos de competición se pueden usar para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos o Fab descritos en el presente documento, por ejemplo, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10 por la unión a BACE1. En ciertos modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que está unido por cualquiera de los anticuerpos o Fab descritos en el presente documento, por ejemplo, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10. Se proporcionan ejemplos de

procedimientos detallados para la identificación de un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ejemplo de ensayo de competición, BACE1 inmovilizado se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a BACE1 (por ejemplo, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10) y un segundo anticuerpo no marcado que se está sometiendo a prueba respecto a su capacidad para competir con el primer anticuerpo en la unión a BACE1. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba BACE1 inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a BACE1, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado a BACE1 inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado a BACE1 inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión a BACE1. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de anticuerpos anti-BACE1 que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la inhibición de la actividad aspartil-proteasa de BACE1. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*, por ejemplo, como se evaluó por el ensayo de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) o un ensayo de electroforesis capilar de microfluidos (MCE) usando péptidos sintéticos de sustrato, o *in vivo* en líneas celulares que expresan sustratos de BACE1 tales como PPA.

El anticuerpo (incluyendo el anticuerpo multiespecífico) del presente documento se produce opcionalmente de forma recombinante en una célula huésped transformada con secuencias de ácidos nucleicos que codifican sus cadenas pesadas y ligeras (por ejemplo, cuando la célula huésped se ha transformado por uno o más vectores con el ácido nucleico en los mismos). La célula huésped es opcionalmente una célula de mamífero, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO).

III. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen 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; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); 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; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario, opcionalmente los que tienen actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. El tipo y las cantidades eficaces de dichos medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación y de los parámetros clínicos de los sujetos. A continuación, se analizan ejemplos de dichos medicamentos.

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(metilmacrilato), 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.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

En un modo de realización, la formulación es isotónica.

5

IV. Usos terapéuticos de los anticuerpos anti-R-BHE

10

15

20

Los anticuerpos anti-R-BHE (incluyendo anticuerpos multiespecíficos que comprenden los mismos) se pueden utilizar en una variedad de procedimientos *in vivo*. 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-R-BHE acoplado a un compuesto terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que se une tanto a R-BHE 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 el anticuerpo anti-R-BHE acoplado a un fármaco para trastornos cerebrales (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que se une tanto a R-BHE 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 en esta ocasión están en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), por ejemplo, uno que tiene 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, lesión cerebral traumática, etc.

25

En un modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona de: una neuropatía, amiloidosis, cáncer (por ejemplo, que afecta al SNC o al cerebro), una enfermedad o trastorno ocular, una infección vírica o microbiana, inflamación (por ejemplo, del SNC o el cerebro), isquemia, enfermedad neurodegenerativa, convulsiones, trastornos del comportamiento, enfermedad de almacenamiento lisosómico, etc.

30

Los trastornos neuropáticos son enfermedades o anomalías del sistema nervioso que se caracterizan por señales nerviosas inapropiadas o no controladas o falta de ellas, e incluyen, pero no se limitan a, dolor crónico (incluyendo dolor nociceptivo), dolor causado por una lesión en tejidos corporales, incluyendo dolor relacionado con el cáncer, dolor neuropático (dolor causado por anomalías en los nervios, la médula espinal o el cerebro) y dolor psicógeno (en su totalidad o en su mayoría 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.

35

40

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades y trastornos asociados a los depósitos proteicos extracelulares en el SNC, incluyendo, pero no limitado a, amiloidosis secundaria, amiloidosis relacionada con la edad, enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve (DCL), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo Guam de parkinsonismo-demencia, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, encefalopatía esponjiforme transmisible, demencia relacionada con el VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis con cuerpos de inclusión (MCI) y las enfermedades oculares relacionadas con el depósito de beta-amiloide (es decir, degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusen y cataratas).

45

Los cánceres del SNC se caracterizan por la proliferación aberrante 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 extradural, intramedular o intradural.

50

55

60

Las enfermedades o trastornos oculares SON enfermedades o trastornos del ojo, que para los fines del presente documento se considera un órgano del SNC sujeto a la BHE. Las enfermedades o trastornos oculares incluyen, pero no se limitan a, trastornos de la esclerótica, la córnea, el iris y el cuerpo ciliar (es decir, escleritis, queratitis, úlcera de la córnea, abrasión de la córnea, nifablepsia, ojo de arco, queratopatía punteada superficial de Thygeson, neovascularización de la córnea, distrofia de Fuchs, queratocono, queratoconjuntivitis seca, iritis y uveítis), trastornos del cristalino (es decir, cataratas), trastornos de la coroides y la retina (es decir, desprendimiento de la 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, flóculos, trastornos del nervio óptico y de las vías visuales (es decir, neuropatía óptica hereditaria de Leber y drusens del disco óptico), trastornos de los músculos oculares/adaptación al movimiento binocular/refracción (es decir, estrabismo, oftalmoparesia, oftalmoplejía externa progresiva, esotropía, exotropía, hipermetropía, miopía, astigmatismo, anisometropía, presbicia y oftalmoplejía), trastornos de la visión y ceguera (es decir, ambliopía, amaurosis congénita de Leber, escotoma, daltonismo, acromatopsia, nictalopía, ceguera, ceguera del río y microoftalmia/coloboma), enrojecimiento de los ojos, pupila de Argyll Robertson, queratomycosis, xeroftalmia y andaniridia.

65

Las infecciones víricas o microbianas del SNC incluyen, pero no se limitan a, infecciones por virus (es decir, gripe, VIH, virus de la polio, 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 no limitado a, meningitis, encefalitis, mielitis, vasculitis y absceso, que pueden ser agudas o crónicas.

5 La inflamación del SNC es la inflamación que se produce por una lesión en el SNC, que puede ser una lesión física (es decir, debida a un accidente, cirugía, traumatismo cerebral, lesión de la médula espinal, conmoción cerebral) o una lesión debida a o en relación con una o más enfermedades o trastornos del SNC (es decir, absceso, cáncer, infección vírica o microbiana).

10 La isquemia del SNC, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de trastornos relacionados con el flujo de sangre o comportamiento vascular aberrante en el cerebro o 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.

15 Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la pérdida de función o muerte de células neuronales 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 causada por o asociada a una amiloidosis, ataxia de Friedreich, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de Kennedy, atrofia de múltiples sistemas, esclerosis múltiple, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, atrofia muscular espinal, mielitis transversa, enfermedad de Refsum y ataxia espinocerebelosa.

25 Las enfermedades y trastornos de convulsiones del SNC implican una conducción eléctrica inapropiada y/o anormal en el SNC, e incluyen, pero no se limitan a: epilepsia (es decir, crisis de ausencia, convulsiones atónicas, epilepsia rolándica benigna, ausencia de la niñez, 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 autonómicas, mioclonía bilateral masiva, epilepsia catamenial, convulsiones de gota, convulsiones emocionales, convulsiones focales, convulsiones gelásticas, marcha jacksoniana, enfermedad de Lafora, convulsiones motoras, convulsiones multifocales, convulsiones nocturnas, convulsiones fotosensibles, pseudo-convulsiones, convulsiones sensoriales, convulsiones sutiles, convulsiones de Sylvan, convulsiones por abstinencia y convulsiones reflejas visuales).

35 Los trastornos del comportamiento son trastornos del SNC caracterizados por un comportamiento aberrante por parte del sujeto afligido e incluyen, pero no se limitan a: trastornos del sueño (es decir, insomnio, sonambulismo, terrores nocturnos, trastornos del sueño del ritmo circadiano y narcolepsia), trastornos del estado de ánimo (es decir, depresión, depresión suicida, ansiedad, trastornos afectivos crónicos, fobias, ataques de pánico, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastorno por déficit de atención (TDA), síndrome de fatiga crónica, agorafobia, trastorno de estrés postraumático, trastorno bipolar), trastornos alimentarios (es decir, anorexia o bulimia), psicosis, trastornos de comportamiento 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).

50 Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son trastornos metabólicos que, en algunos casos, están asociados al 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), enfermedad de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis GM1, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Farber, leucodistrofia de Canavan y lipofuscinosis ceroides neuronal tipo 1 y 2, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Pompe y enfermedad de Krabbe.

55 En un aspecto, el anticuerpo se usa para detectar un trastorno neurológico antes de la aparición 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 formación de imágenes por radiografía, tomografía o formación de imágenes de resonancia magnética (IRM).

60 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-R-BHE de baja afinidad para su uso como medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-R-BHE de baja afinidad para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). En ciertos modos de realización, se proporciona un anticuerpo anti-R-BHE de baja afinidad para su uso en un procedimiento de tratamiento. En ciertos modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-R-BHE de baja afinidad para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-R-BHE (opcionalmente acoplado a un fármaco para trastornos neurológicos). En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende además la administración al

individuo de una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En modos de realización adicionales, la invención proporciona un anticuerpo anti-R-BHE para su uso en la reducción o inhibición de la formación de placas amiloides 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 cierto aspecto, el anticuerpo anti-R-BHE para uso en los procedimientos de la invención mejora la captación del fármaco para trastornos neurológicos al que está acoplado.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-R-BHE de baja afinidad 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 un modo de realización adicional, el medicamento es para uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico que comprende la administración de una cantidad eficaz del medicamento a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende además la administración al individuo de una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para tratar la enfermedad de Alzheimer. En un modo de realización, el procedimiento comprende la administración a un individuo que tiene enfermedad de Alzheimer de una cantidad eficaz de un anticuerpo multiespecífico que se une tanto a BACE1 como a Tfr. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende además la administración al individuo de 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-R-BHE de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-R-BHE de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En ciertos modos de realización, un agente terapéutico adicional es un agente terapéutico eficaz para el tratamiento de un trastorno neurológico igual o diferente al trastorno neurológico que se está tratando con el anticuerpo anti-R-BHE. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales 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 beta amiloide, antioxidantes, moduladores de γ -secretasa, factor de crecimiento nervioso (FCN), tratamiento génico con NGF o similar, agonistas de PPAR γ , inhibidores de la HMS-CoA reductasa (estatinas), ampakinas, bloqueadores del canal de calcio, antagonistas del receptor GABA, inhibidores de la glucógeno sintasa cinasa, inmunoglobulina intravenosa, agonistas del receptor muscarínico, moduladores de receptores nicotínicos, inmunización activa o pasiva con péptido beta amiloide, inhibidores de fosfodiesterasa, antagonistas del receptor de serotonina y anticuerpos anti-péptido beta amiloide. En ciertos modos de realización, se selecciona al menos un agente terapéutico adicional por su capacidad para mitigar uno o más efectos secundarios del fármaco neurológico.

Dichos tratamientos de combinación indicados anteriormente abarcan la administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención se pueden producir antes de, simultáneamente y/o después de, la administración del agente y/o adyuvante terapéutico adicional. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en combinación con otros tratamientos de intervención tales como, pero no limitados a, radioterapia, tratamiento del comportamiento u otros tratamientos conocidos en la técnica y apropiados para el trastorno neurológico que se va a tratar o prevenir.

El anticuerpo anti-R-BHE de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación se puede realizar 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 varios programas de dosificación incluyendo, pero no limitados a, administraciones individuales o múltiples en varios puntos temporales, la administración en bolo y la infusión pulsada.

Los procedimientos basados en lípidos para el transporte del anticuerpo o fragmento del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, el encapsulado del anticuerpo o fragmento del mismo en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión a anticuerpo que se unen a los receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20020025313) y el recubrimiento del anticuerpo o fragmento activo del mismo en partículas de lipoproteínas de baja densidad (véase, p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20040204354) o apolipoproteína E (véase, p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20040131692).

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no lo necesita, pero opcionalmente se formula, con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o

tratar el trastorno en cuestión. 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 dosis y con vías de administración como las descritas en el presente documento, o aproximadamente de un 1 al un 99 % de las dosis descritas en el presente documento, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determina que es empíricamente/clínicamente apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la historia clínica del paciente y de su respuesta al anticuerpo y del criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis 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, el tratamiento se mantendrá, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (p. ej., de tal manera que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, p. ej., aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de este tratamiento se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

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

V. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o en combinación con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un puerto 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 hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Por otra parte, 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 terapéutico de otra manera. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender, además, un prospecto que indica 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 comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (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 del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunocombinado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-R-BHE.

El artículo de fabricación opcionalmente comprende, además, un prospecto con instrucciones para el tratamiento de un trastorno neurológico en un sujeto, en el que las instrucciones indican que el tratamiento con el anticuerpo que se divulga en el presente documento trata el trastorno neurológico y, opcionalmente, indica que el anticuerpo tiene captación mejorada a través de la BHE debido a su baja afinidad por el R-BHE.

III. EJEMPLOS

Este ejemplo evaluó el receptor de transferrina (TfR), que media el transporte de hierro al cerebro a través del complejo holo-transferrina (Skarlatos *et al. Brain Res* 683: 164-171 (1995)). Un anticuerpo quimérico humano anti-receptor murino de transferrina (anti-TfR^A) que no compite con la unión a TfR de la transferrina endógena se comparó con una IgG humana de control en un experimento de marcado doble para la captación en el cerebro de ratón natural. Una dosis traza única (aproximadamente 50 µg/kg) de [¹³¹I]anti-TfR^A e [¹²⁵I]IgG de control se inyectó en ratones naturales por vía intravenosa (i.v.) y se midió la captación en el cerebro a los 5 min, 0,5, 1, 4, 24, 48 y 72 horas. Se observó un aumento significativo de la captación de [¹³¹I]anti-TfR^A en el cerebro, medido como un porcentaje de la dosis inyectada por gramo

de cerebro, en todos los puntos temporales (figura 1A). En su valor máximo, 1 hora después de la inyección, había una diferencia > 11 veces en la acumulación en el cerebro de [¹³¹I]anti-TfR^A en comparación con [¹²⁵I]IgG de control (n = 6). Si también se coadministraba anti-TfR^A no marcado (4 mg/kg de peso corporal), la acumulación en el cerebro de [¹³¹I]anti-TfR^A se reducía casi al nivel de IgG de control, indicando una captación específica dirigida a la diana.

Para evaluar si la captación significativa de anticuerpo en el cerebro también se produce a niveles de dosis terapéuticas, a los ratones naturales se les administró anti-TfR^A o IgG de control a 20 mg/kg por vía intravenosa (i.v.). La concentración de anticuerpo humano en la corteza y en suero se determinó 1 y 24 horas después de la inyección usando un ELISA en sándwich de Fc humano. Brevemente, después del tiempo indicado de administración, los ratones se sometieron a perfusión con D-PBS a una velocidad de 2 ml/min durante 8 minutos. Se extrajeron los cerebros y se aislaron la corteza y el hipocampo, se homogeneizaron en NP-40 (Cal-Biochem) al 1 % en PBS que contenía comprimidos de un cóctel de inhibidores de proteasa Complete Mini sin EDTA (Roche Diagnostics). Las muestras de cerebro homogeneizadas se agitaron a 4 °C durante 1 hora antes de su centrifugación a 14.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se aisló para la medición de anticuerpos en el cerebro. Se recogió sangre completa antes de la perfusión en tubos de microrrecipiente separadores de suero (BD Diagnostics), se dejó coagular durante al menos 30 minutos y se centrifugó a 5.000 x g durante 90 segundos. El sobrenadante se aisló para mediciones de anticuerpos en suero. Las concentraciones de anticuerpo en muestras de suero y de cerebro de ratón se midieron mediante ELISA. Se recubrieron inmunoplasmas NUNC de 384 pocillos Maxisorp (Neptuno, NJ) con fragmento F(ab')₂ de anticuerpo policlonal de burro anti-IgG humana, específico del fragmento Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 0,5 % durante 1 hora a 25 °C. Cada anticuerpo se usó como estándar interno para cuantificar la concentración del anticuerpo respectivo. Las placas se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % usando un lavador de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Los estándares y las muestras se diluyeron en PBS que contenía BSA al 0,5 %, NaCl 0,35 M, CHAPS al 0,25 %, EDTA 5 mM, Tween 20 al 0,05 % y 15 ppm de Proclin, y se añadieron a la microplaca durante dos horas a 25 °C. El anticuerpo unido se detectó con anticuerpo policlonal de cabra F(ab')₂ anti-IgG humana, específico de Fc, conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch), revelado usando 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD) y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Las concentraciones se determinaron a partir de la curva estándar usando un programa de regresión no lineal de cuatro parámetros. El ensayo tenía un límite inferior de valores de cuantificación (LLOQ) de 3,12 ng/ml en suero y de 15,6 ng/g en cerebro. El análisis estadístico de las diferencias entre los grupos experimentales se realizó mediante una prueba de la T para datos independientes bilateral.

En comparación con la IgG de control, la concentración de anti-TfR^A fue significativamente más alta en el cerebro 24 horas después de la administración del anticuerpo (figura 1B, p = 0,0002, n = 10). Adicionalmente, la concentración de IgG humana en cerebro fue > 2,5 veces mayor en comparación con la concentración en suero de anti-TfR^A en comparación con IgG de control a las 24 horas (figura 1C, p = 0,003, n = 10). Junto con los datos de dosis traza radiomarcadas, estos resultados indican que el anti-TfR^A administrado por vía sistémica se puede acumular en el cerebro; sin embargo, la distribución tisular de anticuerpo en el cerebro se sigue sin comprender.

Para abordar la distribución de los anticuerpos administrados por vía sistémica en el cerebro, a ratones naturales se les inyectó 20 mg/kg i.v. de anti-TfR^A o IgG de control, perfundidos con PBS para eliminar cualquier anticuerpo restante en la circulación, y las secciones de cerebro se tiñeron con IgG secundaria anti-humano fluorescente para determinar la localización de los anticuerpos. Después de 1 hora de circulación, el anti-TfR^A tenía una distribución vascular pronunciada, como se indica por su colocalización con el marcador de membrana basal anti-colágeno IV (figura 1D, columna de la izquierda). Aunque menos pronunciada, la IgG de control también se localiza en la vasculatura, lo que indica que después de 1 hora de exposición, la IgG administrada sistémicamente a niveles de dosis terapéuticas mantiene una distribución vascular (figura 1E, columna de la izquierda). Sin embargo, había una marcada diferencia en la localización del anticuerpo 24 horas después de la inyección. La distribución de anti-TfR^A ya no era exclusivamente vascular, sino que mostraba una tinción moderada del parénquima (figura 1D, columnas de la derecha). En contraste, el anticuerpo IgG de control estaba en gran medida ausente en el tejido cerebral 24 horas después de la inyección (figura 1E, columnas de la derecha). Estos resultados indican que, cuando se dosifica a niveles terapéuticamente relevantes, el anti-TfR^A puede penetrar en la BHE, como se evidencia por la tinción moderada del parénquima; sin embargo, la mayor parte del anticuerpo acumulado en el cerebro se limitaba en gran medida a las células endoteliales de la BHE.

La acumulación en el parénquima requiere la unión a TfR de superficie que se expresan en las células endoteliales cerebrales, así como la disociación del receptor tras el transporte mediado por receptores (TMR). Sin estar ligado a teoría alguna, se planteó la hipótesis de que la afinidad reducida por TfR puede facilitar la disociación después de TMR y permitir una acumulación potenciada en el parénquima. Además, un anti-TfR con afinidad reducida se capturaría y transportaría con menos eficacia en un entorno de concentración limitada, tal como en el cerebro, en el que las concentraciones de anti-TfR son bajas. En un entorno clínico, sin embargo, los niveles séricos de un anti-TfR terapéutico todavía serían suficientemente altos para mantener la saturación del receptor en la cavidad vascular.

Para someter a prueba esta predicción, se generaron variantes de anti-TfR^A que varían en su afinidad de unión por TfR. Estas variantes se sometieron a prueba en un ensayo ELISA de competición (figura 2A); el anti-TfR^A tenía la afinidad más fuerte y la CI50 más baja de cualquiera de los anticuerpos sometidos a prueba para TfR, y cada uno de los anti-TfR^{B, C, D} tenía sucesivamente menor afinidad y mayor CI50. Más tarde, se generó la variante anti-TfR^E y se sometió a

prueba en el mismo ensayo junto con las variantes anti-TfR^{A, B, C, D}; como se muestra en la figura 2A, era sustancialmente menos capaz de competir por la unión a TfR que cualquiera de los otros anticuerpos anti-TfR sometidos a prueba, y tenía un valor de CI50 alto correspondiente (tabla 2).

5 **TABLA 2: Mediciones de CI50 para los anticuerpos anti-TfR**

Anticuerpo	CI50 (nM)	Desviación estándar
Anti-TfR ^A	1,7	0,1
Anti-TfR ^B	6,9	0,4
Anti-TfR ^C	65	12
Anti-TfR ^D	111	16
Anti-TfR ^E	> 5 x 10 ⁴	-

Estas variantes se sometieron a prueba tanto en un entorno no saturante de TfR (dosis traza) como en uno saturante de TfR (dosis terapéutica). Los niveles traza de [¹²⁵I]anti-TfR^A, [¹²⁵I]anti-TfR^B, [¹²⁵I]anti-TfR^C, [¹²⁵I]anti-TfR^D y [¹²⁵I]anti-TfR^E (que varían en la afinidad por TfR, con la afinidad de anti-TfR^A > afinidad de anti-TfR^B > afinidad de anti-TfR^C > afinidad de anti-TfR^D > afinidad de anti-TfR^E) se inyectaron i.v. en ratones y se midió la captación en el cerebro 1, 4 o 24 horas después de la inyección. Este ensayo se realizó originalmente con [¹²⁵I]anti-TfR^A, [¹²⁵I]anti-TfR^B, [¹²⁵I]anti-TfR^C y [¹²⁵I]anti-TfR^D, y más tarde se repitió tras la construcción de [¹²⁵I]anti-TfR^E, cuyos resultados se muestran en la figura 2B. En consonancia con el modelo propuesto, los niveles de dosis traza de los anticuerpos anti-TfR de menor afinidad dieron como resultado una menor captación en el cerebro en comparación con las variantes de mayor afinidad (figura 2B). En notable contraste con la dosis traza, sin embargo, la captación en el cerebro de estas mismas variantes de menor afinidad a niveles terapéuticos (20 mg/kg evaluados a 1 y 24 horas) mostraron un aumento de la captación en el cerebro a las 24 horas a medida que se reducía la afinidad, mientras que no se observaron diferencias significativas en la captación a 1 hora (figura 2C). Estos datos apoyan la hipótesis de que un anticuerpo TMR de menor afinidad mostraría un transporte disminuido a concentraciones limitantes mientras que el transporte en condiciones de saturación no se vería afectado.

Por lo tanto, se propone el siguiente modelo: en comparación con un anticuerpo de alta afinidad, un menor número de anticuerpos de baja afinidad se unen a receptores en el lado luminal de la vasculatura a concentraciones no saturantes, lo que lleva a reducir la captación endotelial (figura 2D, paneles de la izquierda.). A una dosis terapéutica más alta, sin embargo, los receptores luminales se saturarían independientemente de la afinidad, dando como resultado una captación endotelial similar (figura 2D, paneles de la derecha). En estas condiciones, los anticuerpos TMR de menor afinidad pueden lograr una mayor acumulación en el cerebro 1) maximizando la disociación de la diana de TMR facilitando su liberación en el cerebro, y 2) reduciendo la probabilidad de flujo saliente desde el cerebro ya que las concentraciones están limitadas en el lado del parénquima de la BHE. Por lo tanto, en un entorno terapéutico, un anticuerpo de menor afinidad para una diana de TMR es sorprendentemente ventajoso para su acumulación en el parénquima.

Para evaluar la localización de estas variantes que muestran una mayor captación en el cerebro, los ratones recibieron dosis i.v. de 20 mg/kg del anti-TfR^A de alta afinidad o de las variantes anti-TfR^{B, C, D} de menor afinidad. Después de 24 horas, los animales se perfundieron con PBS y las secciones del cerebro se cotiñeron para IgG humana y el marcador neuronal NeuN (figura 2E). Como se observa anteriormente, los animales tratados con anti-TfR^A de alta afinidad mostraron tinción principalmente vascular con bajos niveles de señal del parénquima (figura 2E, fila superior). Sin embargo, los anti-TfR^{B, C, D} de menor afinidad mostraron tinción celular notablemente más pronunciada que no afecta a los vasos sanguíneos corticales (figura 2E, datos para anti-TfR^{B, C, D}). Además, la tinción colocalizada con NeuN indicó una redistribución del anticuerpo de la vasculatura a las neuronas. Esto es especialmente pronunciado en una imagen de mayor aumento representativa de la variante anti-TfR^D (figura 2F). Junto con los datos de captación en el cerebro, estos resultados indican que se puede lograr una acumulación cerebral del anticuerpo significativamente mayor reduciendo la afinidad de anti-TfR por TfR, y que los anticuerpos de menor afinidad, tales como anti-TfR^D, se distribuyen selectivamente a las neuronas.

El transporte de anticuerpos anti-TfR a través de la BHE se estableció, además, en la evaluación de un anticuerpo biespecífico (anti-TfR^A/BACE1) que se une tanto a TfR como a la enzima de escisión de la proteína precursora amiloide (PPA), beta-secretasa (BACE1) (figura 3A). El anti-TfR^A alta afinidad se usó para diseñar el brazo de unión a TfR del anticuerpo biespecífico usando la tecnología de "botón en ojal" (knob-in-hole) estándar de construcción de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Ridgway *et al.*, Protein Eng (1996) 9(7): 617-621). Además de las mutaciones de "botón" y de "ojal" en Fc de anti-TfR (ojal) y anti-BACE1 (botón), el brazo anti-TfR del anticuerpo comprendía una mutación en la región Fc que suprimía la glucosilación (N297G). Los semianticuerpos "botón" y "ojal" se purificaron por separado y se hibridaron para generar una IgG biespecífica aglucosilada *in vitro*. La afinidad de unión del anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 por TfR se redujo considerablemente en comparación con el anti-TfR^A precursor debido a la pérdida de unión bivalente (figura 3B). BACE1 se expresa principalmente en las neuronas del SNC y se considera que es el principal contribuyente de la formación de beta-amiloide (Aβ₁₋₄₀) a través de la escisión de PPA (Vassar *et al.*, Science 286:735-741 (1999)). Un anticuerpo contra BACE1 se ha descrito como un medio eficaz para inhibir la actividad de BACE1, y puede reducir la producción de Aβ₁₋₄₀ *in vivo*. La inhibición de BACE1 por anti-TfR/BACE1 se examinó en una línea celular HEK293 que expresa PPA de manera estable. En comparación con anti-BACE1, el anticuerpo biespecífico

tenía una eficacia y potencia similares en la inhibición de la producción de $A\beta_{1-40}$, lo que sugiere que el anti-TfR/BACE1 es un inhibidor de molécula grande totalmente funcional de la actividad de BACE1 (figura 3C).

Basándose en este modelo, cabría esperar que este anticuerpo biespecífico de menor afinidad sea un candidato más favorable para un aumento de la captación en comparación con el anti-TfR solo. Para investigar la acumulación cerebral del anticuerpo biespecífico, se compararon dosis traza de [125 I]anti-TfR^A/BACE1 con [125 I]anti-TfR^A y [125 I]anti-BACE1 y se evaluó la captación en el cerebro 30 min, 6, 24 y 48 horas después de la inyección i.v. Se observó una captación en el cerebro significativamente mayor con [125 I]anti-TfR/BACE1 en comparación con [125 I]anti-BACE1 en todos los puntos temporales (figura 3D, n = 4). Coherente con la hipótesis de afinidad, la captación en el cerebro de esta dosis traza no saturante de [125 I]anti-TfR^A fue mucho mayor que la de [125 I]anti-TfR^A/BACE1 de menor afinidad. Para evaluar la acumulación de anticuerpos a niveles de dosis terapéuticas, a los ratones se les inyectó i.v. anti-TfR^A/BACE1 o anti-BACE1 a 20 mg/kg y se determinó la captación en el cerebro de los anticuerpos después de 1, 12, 24 y 48 horas. En comparación con el anti-BACE1 monoespecífico, la administración del anticuerpo biespecífico anti-TfR^A/BACE1 dio como resultado una captación en el cerebro significativamente mayor en todos los puntos temporales (figura 3E). Tal como predijo el modelo de afinidad, el alcance de la captación fue significativamente mayor que el del anti-TfR^A solo de mayor afinidad (compárese la figura 3E y 1B). La acumulación máxima se alcanzó 24 horas después de la inyección, alcanzando concentraciones de ~ 20 nM y se mantuvo elevada 48 horas después de la inyección, incluso cuando los niveles periféricos del anticuerpo disminuyeron hasta un ~ 12 % de su concentración a 1 hora. La captación potenciada con el anticuerpo biespecífico es drásticamente evidente cuando se compara el porcentaje promedio del anticuerpo en el cerebro frente al suero (figura 3F).

Para determinar la localización de anti-TfR^A/BACE1 después de la administración sistémica, los ratones se sometieron a perfusión con PBS 24 horas después de la inyección, y la distribución de los anticuerpos se visualizó con anticuerpo secundario anti-humano fluorescente (figura 3G). De forma similar a la localización del anticuerpo anti-TfR de menor afinidad, hubo una tinción sustancial del parénquima además de la tinción vascular. La colocalización en el parénquima con NeuN indicó que estos anticuerpos estaban localizados en la población neuronal. En contraste, los animales a los que se les había inyectado IgG de control mostraron una completa ausencia de tinción tanto vascular como del parénquima. En conjunto, estos datos indican que el anticuerpo biespecífico anti-TfR^A/BACE1 atraviesa la BHE y se puede acumular de manera significativa en el parénquima cerebral.

Para evaluar la eficacia de anti-TfR^A/BACE1 en la producción de $A\beta_{1-40}$ *in vivo*, a ratones naturales se les administró una dosis única de 25 mg/kg o 50 mg/kg de IgG de control, anti-BACE1 o anti-TfR/BACE1. Basándose en la observación de que la captación de anticuerpos en el cerebro alcanza su máximo 24 horas después de la inyección (véase la figura 3E), se determinaron los niveles de $A\beta_{1-40}$ en cerebro y plasma 24 y 48 horas después de la administración i.v. de los anticuerpos. A una dosis de 25 mg/kg, anti-TfR^A/BACE1 fue capaz de reducir significativamente los niveles de $A\beta_{1-40}$ en el cerebro en comparación con la IgG de control tanto 24 ($p = 0,001$, $n = 10$) como 48 ($p = 0,0003$, $n = 10$) horas después de la inyección, mientras que anti-BACE1 no tuvo ningún efecto sobre la reducción de $A\beta_{1-40}$ (figura 4A). A una dosis de 50 mg/kg, anti-TfR^A/BACE1 tuvo un efecto aún más drástico en la reducción de los niveles de $A\beta_{1-40}$ en el cerebro en ambos puntos temporales en comparación con la IgG de control (figura 3B, $p < 0,0001$, $n = 10$ para 24 y 48 h). La administración de anti-BACE1 a esta dosis también redujo significativamente los niveles de $A\beta_{1-40}$ en el cerebro en comparación con el control ($p < 0,0001$, $n = 10$ para 24 h; $p = 0,006$, $n = 10$ para 48 h), aunque en un grado significativamente menor que el anticuerpo biespecífico anti-TfR^A/BACE1 ($p < 0,0001$, $n = 10$ para 24 y 48 h). Cabe señalar que la capacidad del anticuerpo biespecífico de reducir los niveles de $A\beta_{1-40}$ fue de 2 a 3 veces mayor que anti-BACE1 en todos los puntos temporales y dosis medidos. El efecto máximo de anti-TfR^A/BACE1 se alcanzó 48 horas después de la inyección a una dosis de 50 mg/kg, con una reducción de un $50,0 \pm 1,9$ % en $A\beta_{1-40}$ en el cerebro en comparación con la IgG de control (figura 4E). También se observaron reducciones significativas en los niveles periféricos de $A\beta_{1-40}$ en ambas dosis y puntos temporales para anti-TfR^A/BACE1 (figura 4C-D). El tratamiento con anti-BACE1 dio como resultado una reducción en los niveles periféricos de $A\beta_{1-40}$ solamente en el punto temporal de 24 horas ($p = 0,01$ para 25 mg/kg, $p = 0,002$ para 50 mg/kg; $n = 10$ para cada uno). Estos datos confirman que los anticuerpos diseñados para atravesar la BHE pueden ser farmacodinámicamente eficaces. Además, el aumento de la penetrancia en el cerebro del anticuerpo biespecífico hace que sea un fármaco inhibidor de BACE1 más potente reduciendo significativamente los niveles de $A\beta_{1-40}$ en el cerebro.

A dosis terapéuticas de 20 mg/kg, sin embargo, la penetrancia de la BHE y la entrada en las partes no vasculares del SNC se potenció en los animales tratados con anti-TfR^E en relación con los animales tratados con anti-TfR^A o anti-TfR^D (figura 8B). Cabe señalar que anti-TfR^D alcanzó una concentración inicial más alta en el cerebro, que disminuyó de manera constante después del día 2; por otro lado, anti-TfR^E conservó un nivel de exposición cerebral constantemente elevado durante el período de prueba de 8 días. En relación con esto, la concentración de anti-TfR^E en suero disminuyó en menor proporción que en el resto de los anticuerpos anti-TfR durante el periodo evaluado (figura 8A). En conjunto, estos datos indican que, en general, una menor afinidad por el TfR reduce sorprendentemente la eliminación en suero y aumenta la exposición en el cerebro, pero que, en algún umbral, la menor afinidad empieza a alterar la exposición máxima en el cerebro obtenible con el anticuerpo. En este ejemplo, un nivel óptimo parece encontrarse entre las afinidades de los anticuerpos anti-TfR^D y anti-TfR^E por el receptor de transferrina.

Es importante destacar que estos datos ponen de relieve varios mecanismos causales que están detrás del aumento de la captación de un anticuerpo en el SNC usando una estrategia de anticuerpos de afinidad más baja. En primer lugar,

los anticuerpos anti-TfR de alta afinidad (p. ej., anti-TfR^A, figura 1D) limitan la captación en el cerebro saturando rápidamente el TfR en la vasculatura cerebral reduciendo, por lo tanto, la cantidad total de anticuerpo captado por el cerebro y también restringiendo su distribución a la vasculatura. Sorprendentemente, la reducción de la afinidad (p. ej., anti-TfR^{B-E} y anti-TfR^{A,D,E}/BACE1, figuras 2C, 2E, 2F, 3E-G y 9C) mejora la captación y la distribución en el cerebro, con un desplazamiento robusto observado en la localización de la vasculatura a las neuronas y el neuropilo asociado. En segundo lugar, se propone la menor afinidad del anticuerpo por TfR para alterar la capacidad del anticuerpo de regresar al lado vascular de la BHE a través de TfR desde el lado del SNC de la membrana debido a que la afinidad global del anticuerpo por TfR es baja y la concentración local del anticuerpo en el lado del SNC de la BHE es no saturante debido a la rápida dispersión del anticuerpo al compartimento del SNC (véase, por ejemplo, la figura 1D, 2E y 2F). En tercer lugar, *in vivo*, los anticuerpos con menos afinidad por TfR no se eliminan del sistema tan eficazmente como los que tienen mayor afinidad por TfR (véase la figura 8A y 9B) y, por lo tanto, permanecen en concentraciones circulantes mayores que sus homólogos de mayor afinidad. Esto es ventajoso debido a que los niveles de anticuerpos circulantes del anticuerpo de menor afinidad se mantienen a niveles terapéuticos durante un período de tiempo más largo que el anticuerpo de mayor afinidad, que posteriormente mejoran la captación de anticuerpo en el cerebro durante un período de tiempo más largo (compárese anti-TfR^A/BACE1 con anti-TfR^D/BACE1 en la figura 9C). Además, esta mejora tanto en la exposición en plasma como en cerebro puede reducir la frecuencia de dosificación en la clínica, lo que tendría un 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.

Se llevaron a cabo estudios adicionales para evaluar si la disminución adicional de la afinidad del anticuerpo biespecífico anti-TfR^A/BACE1 podría mejorar aún más su penetrancia en la BHE y el parénquima. Se construyeron dos anticuerpos biespecíficos adicionales: anti-TfR^D/BACE1 y anti-TfR^E/BACE1, usando la misma metodología de construcción empleada para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1. Se realizaron ensayos ELISA de competición (figura 9A) y las CI50 resultantes fueron las siguientes:

TABLA 3: Mediciones de CI50/afinidad para anticuerpos anti-TfR/BACE1

Anticuerpo	CI50	Kd (Biacore) (nM)
Anti-TfR ^A /BACE1	15 nM	33,3 ± 1,7
Anti-TfR ^D /BACE1	1,6 μM	630 ± 50
Anti-TfR ^E /BACE1	> 50 μM	N.D.

También se realizaron mediciones de resonancia de plasmón superficial de Kd para la unión entre cada anticuerpo biespecífico y TfR. El análisis BIACORE® de la tabla 3 se realizó como sigue. La Kd se midió usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE®-T-100 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C usando penta-His Ab de captura (Qiagen, Valencia, CA). Brevemente, chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activaron con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El anticuerpo penta-His se diluyó con acetato de sodio 100 mM, pH 4,0, a 50 μg/ml antes de la inyección a una caudal de 5 μl/minuto para conseguir aproximadamente 10.000 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del anticuerpo, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no habían reaccionado. Para mediciones de cinética, se inyectó MuTfR-Su en HBS-P para alcanzar aproximadamente 50 UR; a continuación, se inyectaron diluciones en serie 1:2 de anti-TfR^A/BACE1 (1,95 nM a 1000 nM) o anti-TfR^D/BACE1 (9,75 nM a 5000 nM) en HBS-P a 25 °C a una caudal de aproximadamente 30 μl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIACORE® versión 3.2) ajustando de forma simultánea los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). La afinidad de anti-TfR^E/BACE1 era demasiado débil para que se determinara por resonancia de plasmón superficial.

Como se muestra en la figura 9A y en las tablas 2 y 3, los anticuerpos biespecíficos anti-TfR^A/BACE1 y anti-TfR^D/BACE1 se unen mucho peor a TfR que el correspondiente anticuerpo monoespecífico anti-TfR^A y anti-TfR^D (compárese la figura 9A y la figura 2A). Para anti-TfR^E/BACE1, las curvas de unión parcial para el anticuerpo biespecífico y monoespecífico también sugieren que el anticuerpo biespecífico anti-TfR^E/BACE1 tiene una CI50 muy superior que el correspondiente anticuerpo monoespecífico anti-TfR^E.

Estos anticuerpos se sometieron a prueba en el mismo ensayo de producción *in vivo* de Aβ₁₋₄₀ descrito anteriormente. Brevemente, a ratones C57BL/6 hembra naturales de 6-8 semanas se les administró a través de inyección i.v. en la vena de la cola una dosis única de 50 mg/kg de IgG de control, anti-BACE1 monoespecífico o anti-TfR^A/BACE1, anti-TfR^D/BACE1 o anti-TfR^E/BACE1, con 6 ratones por tratamiento con anticuerpos por punto temporal, para un total de 180 ratones tratados. Los niveles en cerebro y plasma de Aβ₁₋₄₀ se determinaron 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días después de la administración i.v. de los anticuerpos (figuras 9B-9E). La concentración de los anticuerpos biespecíficos encontrados en el cerebro (figura 9C) en el punto temporal más temprano fue mayor con anti-TfR^A/BACE1 y anti-TfR^D/BACE1, que presentaba cada uno concentraciones de más del doble de la concentración conseguida por anti-TfR^E/BACE1 en el punto temporal de 1 día. Sin embargo, los niveles de concentración cerebral de anti-TfR^A/BACE1 volvieron a los niveles de control el día 6, y los niveles de anti-TfR^D/BACE1 lo hicieron en el día 10. Por el contrario, el anticuerpo biespecífico anti-TfR^E/BACE1 de afinidad más baja tenía una reducción relativa mucho menor en la concentración de anticuerpos en

el cerebro en comparación con anti-TfR^A/BACE1 y anti-TfR^D/BACE1, de acuerdo con el modelo propuesto de que una menor afinidad por anti-TfR disminuye la capacidad del anticuerpo de salir del espacio del parénquima. Los niveles de Abeta1-40 en el cerebro (figura 9E) se redujeron aproximadamente en la misma proporción esperada en las concentraciones observadas de anticuerpo biespecífico en el cerebro: anti-TfR^A/BACE1 y anti-TfR^D/BACE1 presentaron una disminución similar de los niveles observados de Abeta1-40 en el cerebro en los puntos temporales tempranos (días 1-2), que aumentó rápidamente en puntos temporales posteriores (anti-TfR^A/BACE1) o aumentó más moderadamente en puntos temporales posteriores (anti-TfR^D/BACE1), de manera coherente con las disminuciones observadas en la concentración cerebral de cada uno de estos anticuerpos (figura 9C). Cabe destacar que, aunque el tratamiento con anticuerpo anti-TfR^E/BACE1 dio como resultado una reducción en los niveles de Abeta1-40 en cerebro relativamente más moderada que la observada con los otros anticuerpos biespecíficos, esta reducción fue constante en todos los puntos temporales (figura 9E).

Las mediciones en plasma (figura 9B) mostraron que anti-TfR^A/BACE1 se eliminó el día 4, mientras que anti-TfR^D/BACE1 persistió a niveles relativamente bajos en todos los puntos temporales, y que los niveles de anti-TfR^E/BACE1 permanecieron similares a los controles en todos los puntos temporales. De manera coherente con este hallazgo, los niveles de Abeta1-40 en plasma observados (figura 9D) se redujeron de manera similar con respecto a los niveles de anti-gD de control en todos los puntos temporales con cada uno de anti-TfR^D/BACE1, anti-TfR^E/BACE1 y anti-BACE1. El anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 mostró reducciones similares en los puntos temporales de 1, 2 y 4 días, volviendo rápidamente a los niveles de control en puntos temporales posteriores, de acuerdo con la desaparición observada de los anticuerpos del plasma.

Estos resultados demuestran una vez más que los anticuerpos biespecíficos anti-TfR/BACE1 atraviesan eficazmente la BHE e inhiben la actividad de BACE1 en un sistema de mamífero *in vivo*. También sugieren que una afinidad por TfR entre la del anti-TfR^D/BACE1 y la del anti-TfR^E/BACE1 puede proporcionar una combinación óptima de persistencia y actividad en el parénquima/cerebro. Se observa que, sin embargo, para cada diana en el cerebro, la potencia del brazo biespecífico específico para esa diana determinará la cantidad de anticuerpo biespecífico anti-TfR/diana que debe estar presente en el lado del SNC de la BHE para lograr los resultados deseados y, por lo tanto, el grado de afinidad de los anticuerpos anti-TfR por TfR que se debe usar en el anticuerpo biespecífico para obtener esa concentración. La presente invención proporciona un medio para determinar y diseñar el anticuerpo biespecífico para alcanzar dichos niveles diana en el SNC después de la administración en el lado no privilegiado de la BHE.

Estos resultados se confirmaron y ampliaron usando otro anticuerpo biespecífico anti-TfR, anti-TfR/Abeta, que se une tanto a TfR como a beta amiloide. Se prepararon tres variantes biespecíficas: anti-TfR^A/Abeta, anti-TfR^D/Abeta y anti-TfR^E/Abeta, usando los mismos procedimientos que los usados para la preparación del anticuerpo biespecífico anti-TfR/BACE1 anterior. Abeta es el sustituyente principal de las placas amiloides, que se cree que están involucradas en el desarrollo de la EA. La inhibición de la formación de las placas por unión y extracción de Abeta, en su estado libre u oligomerizado, puede inhibir el desarrollo o la progresión de la EA. Se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de cada uno de estos anticuerpos biespecíficos.

Se inyectó i.p. una única dosis de 50 mg/kg de IgG de control, del anticuerpo anti-Abeta mono-específico o de cada anticuerpo biespecífico en ratones C57BL/6J hembra naturales de 8-16 semanas de edad o en ratones que expresan tanto la presenilina humana 2 como la proteína precursora amiloide humana (PS2/PPA). Debido a un número limitado de animales transgénicos, solamente dos de las variantes biespecíficas (anti-TfR^D/Abeta y anti-TfR^E/Abeta) se ensayaron en los ratones PS2/PPA. En cada grupo de tratamiento se trataron de 4 a 6 ratones de réplica. Los ratones se sacrificaron después de 24 horas y se midieron los niveles de fármaco en el cerebro y en el plasma, de forma similar a los estudios de anticuerpos biespecíficos anti-TfR/BACE1. Antes del sacrificio, también se recogieron muestras de sangre 6 horas después de la dosis para una evaluación temprana de las concentraciones de anticuerpos en plasma. Las mediciones en plasma de la concentración de anticuerpos (figuras 10A y 11A) mostraron que todos los anticuerpos estaban presentes a niveles similares 6 horas después de la dosis. Sin embargo, los niveles de anti-Abeta mono-específico de control se redujeron en comparación con la IgG de control a las 24 horas. Esto es similar a las observaciones anteriores para esta molécula anti-Abeta. A las 24 horas, anti-TfR^A/Abeta mostró niveles de anticuerpos similares a anti-Abeta en la periferia, mientras que anti-TfR^D/Abeta y anti-TfR^E/Abeta mostraron niveles ligeramente elevados, intermedios entre anti-Abeta y la IgG de control.

La concentración de los anticuerpos biespecíficos encontrados en el cerebro aumentó en comparación tanto con la IgG de control como con anti-Abeta (figuras 10B y 11B). En comparación con anti-Abeta, anti-TfR^A/Abeta mostró concentraciones 12 veces mayores, anti-TfR^D/Abeta mostró concentraciones de 8 a 15 veces mayores y anti-TfR^E/Abeta mostró concentraciones de 4 a 5 veces mayores. El aumento de la captación en el cerebro de los anticuerpos anti-TfR^{A, D, E}/Abeta en comparación con anti-Abeta era aún mayor que los aumentos observados para los anticuerpos biespecíficos anti-TfR^{A, D, E}/BACE1 en comparación con anti-BACE1. Esto se debe probablemente a la menor exposición periférica de anti-Abeta en comparación con la IgG de control 24 horas después de la dosis, lo que dio como resultado niveles más bajos de anti-Abeta en el cerebro en comparación con la IgG de control.

Estos hallazgos son la primera demostración de que anticuerpos de molécula grande administrados en dosis terapéuticamente relevantes pueden atravesar la BHE y producir una captación en el cerebro significativa y sostenida. Además, estos resultados que demuestran una relación inversa entre la afinidad de los anticuerpos y el alcance de la

captación en el cerebro fomentan la comprensión de la dinámica de TMR. Esta novedosa visión se puede aplicar a una variedad de otras dianas de TMR potenciales para proporcionar una estrategia más eficaz para la administración de fármacos de anticuerpo al SNC. Adicionalmente, estos resultados *in vivo* demuestran que un anticuerpo biespecífico puede mejorar en gran medida la potencia de un agente terapéutico anti-amiloideogénico prometedor aumentando significativamente la penetrancia en el cerebro del fármaco de anticuerpo dirigido. Esto podría ser muy ventajoso, ya que una entrega potenciada del fármaco se traduciría en menos efectos secundarios potenciales gracias a la menor dosis terapéutica requerida. De manera más general, esta tecnología tiene un gran potencial para aplicarse en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades del SNC y representa una estrategia mejorada para proporcionar fármacos de anticuerpo más seguros.

Aunque la invención anterior se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para una mayor claridad y comprensión, las descripciones y los ejemplos no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Lista de secuencias

<110> GENENTECH, INC.

<120> ANTICUERPOS DE BAJA AFINIDAD CONTRA EL RECEPTOR DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y USOS DE LOS MISMOS

<130> P4499R1-WO

<141> 29-11-2011

<150> US 61/418.223

<151> 30-11-2010

<160> 15

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 1

ES 2 631 356 T3

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

<210> 2

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10

<400> 2

ES 2 631 356 T3

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

<210> 3

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10

<400> 3

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

ES 2 631 356 T3

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10 <400> 4

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

<210> 5

<211> 108

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

20

<400> 5

ES 2 631 356 T3

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

Ile Lys Arg

<210> 6

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10

<400> 6

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

Ile Lys Arg

ES 2 631 356 T3

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10 <400> 7

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

<210> 8

<211> 119

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

20

<400> 8

ES 2 631 356 T3

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

<210> 9

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10

<400> 9

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

ES 2 631 356 T3

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10 <400> 10

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

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10 <400> 11

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

<210> 12

<211> 108

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

20

<400> 12

ES 2 631 356 T3

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

<210> 13

<211> 126

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10

<400> 13

Glu val Gln Leu val Glu Ser Gly Gly Gly Leu val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Tyr Ser Ser Ile His Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp val Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr
 95 100 105
 Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 110 115 120
 Leu val Thr val Ser Ser
 125

ES 2 631 356 T3

<210> 14

<211> 438

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 14

Glu val Gln Leu val Glu ser Gly Gly Gly Leu val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly ser Leu Arg Leu ser Cys Ala Ala ser Gly Phe Thr Phe ser
 20 25 30
 ser Tyr Gly Met ser Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Leu val Ala ser Ile Asn ser Asn Gly Gly ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp ser val Lys Gly Arg Phe Thr Ile ser Arg Asp Asn Ala
 65 70 75
 Lys Asn ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala val Tyr Tyr Cys Ala ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Thr val Thr val ser ser Ala ser Thr Lys Gly Pro ser val
 110 115 120
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys ser Arg ser Thr ser Glu ser Thr Ala
 125 130 135
 Ala Leu Gly Cys Leu val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro val Thr
 140 145 150
 val ser Trp Asn ser Gly Ala Leu Thr ser Gly val His Thr Phe
 155 160 165
 Pro Ala val Leu Gln ser ser Gly Leu Tyr ser Leu ser ser val
 170 175 180
 val Thr val Pro ser ser ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 185 190 195
 Asn val Asp His Lys Pro ser Asn Thr Lys val Asp Lys Arg val
 200 205 210
 Glu ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 215 220 225
 Phe Leu Gly Gly Pro ser val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile ser Arg Thr Pro Glu val Thr Cys val val
 245 250 255
 val Asp val ser Gln Glu Asp Pro Glu val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270

10

ES 2 631 356 T3

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 320 325 330
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 335 340 345
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 350 355 360
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 365 370 375
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 380 385 390
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 395 400 405
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 410 415 420
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 425 430 435
 Ser Leu Gly

<210> 15

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

10

<400> 15

ES 2 631 356 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
 20 25 30
 Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 110 115 120
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 125 130 135
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 140 145 150
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 155 160 165
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 170 175 180
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 185 190 195
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 200 205 210
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), apoplejía, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral
10 amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión cerebral traumática en un mamífero, en el que el agente comprende un anticuerpo que se une al receptor de transferrina (TfR) y está acoplado a un fármaco para trastornos neurológicos o un compuesto para la formación de imágenes, en el que el anticuerpo se ha seleccionado para que tenga una CI50 de
15 100 nM a 100 μ M para TfR y, por lo tanto, mejora la captación en el SNC del anticuerpo y del fármaco o el compuesto para la formación de imágenes acoplado a través de la barrera hematoencefálica.
- 20 2. Un agente para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en 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 y lesión cerebral traumática en un mamífero, en el que el agente es un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a TfR y que tiene una CI50 de 100 nM a 100 μ M y, por lo tanto, mejora la captación en el SNC del anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral.
- 25 3. El agente de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo no perjudica la unión de transferrina al TfR.
4. El agente de la reivindicación 2-3, en el que el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor 6 de muerte (DR6), proteína precursora amiloide (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75) y caspasa 6.
- 30 5. El agente de las reivindicaciones 2 - 4, en el que el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1.
6. El agente de las reivindicaciones 2 - 4, en el que el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta.
- 35 7. El agente de las reivindicaciones 2 - 6, en el que el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo.

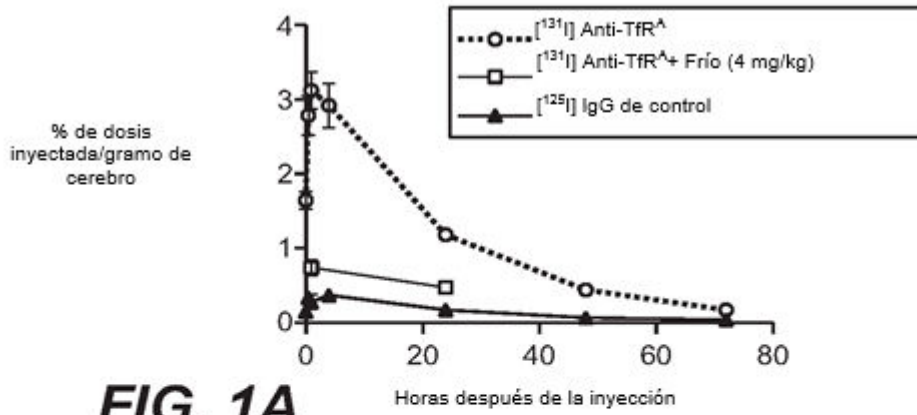


FIG. 1A

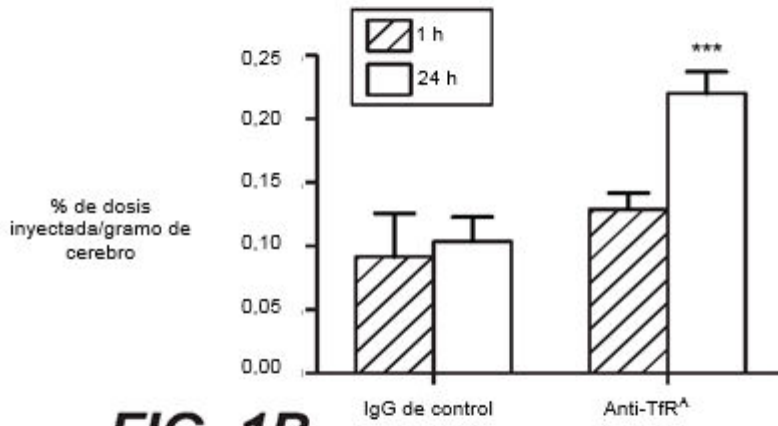


FIG. 1B

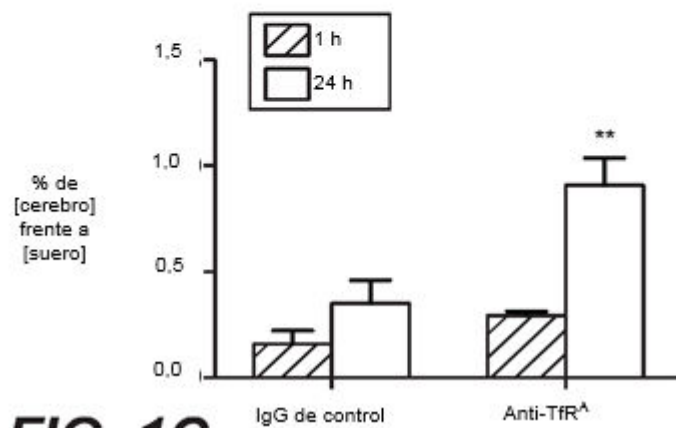


FIG. 1C

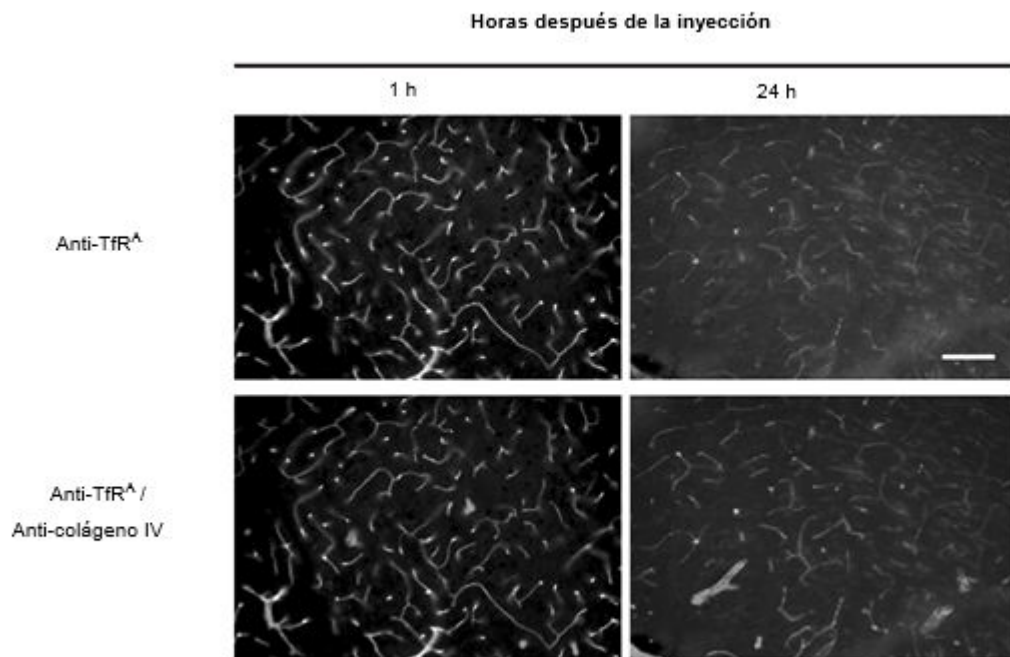


FIG. 1D

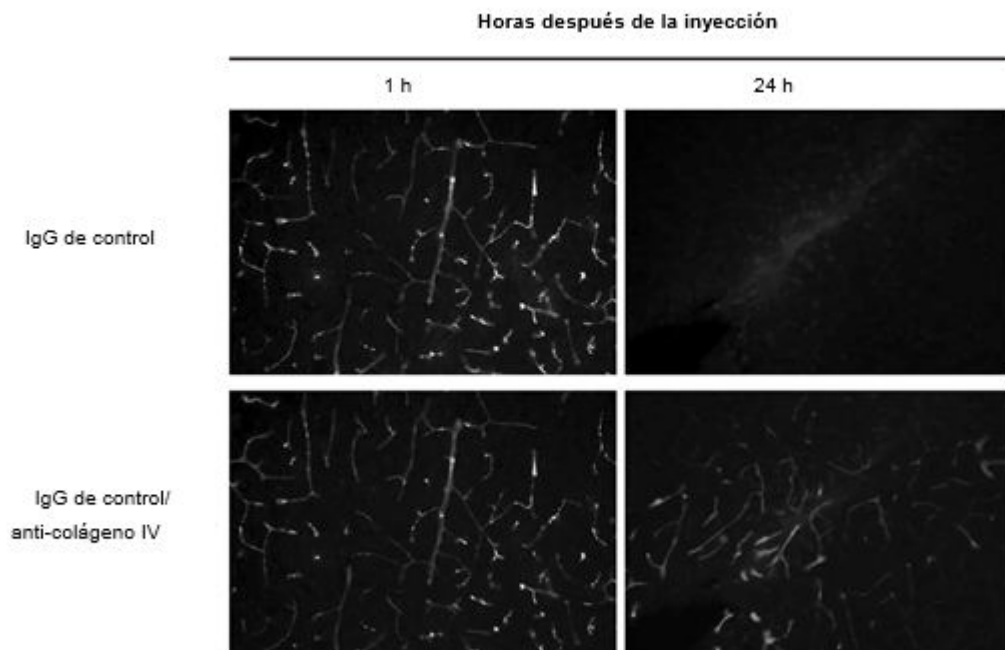


FIG. 1E

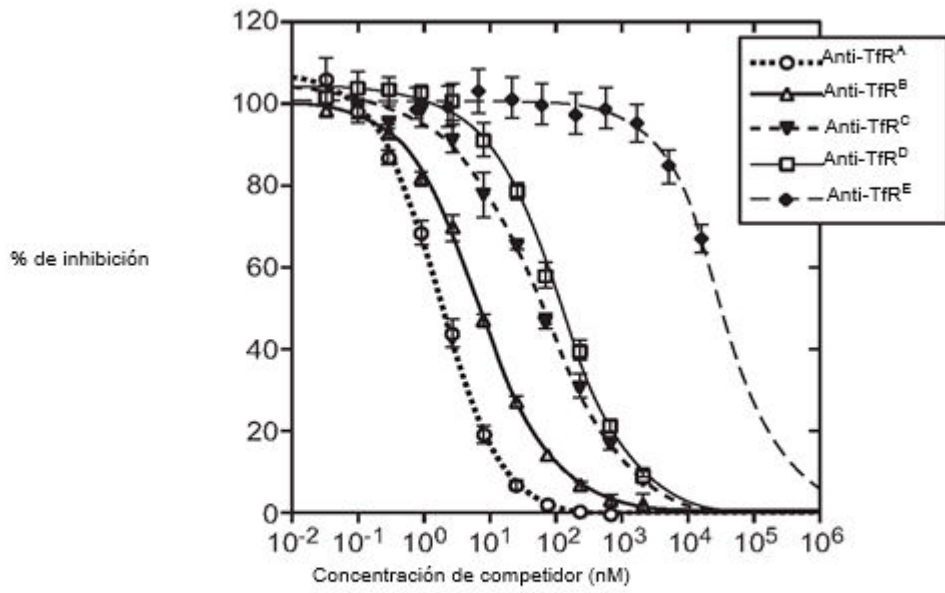


FIG. 2A

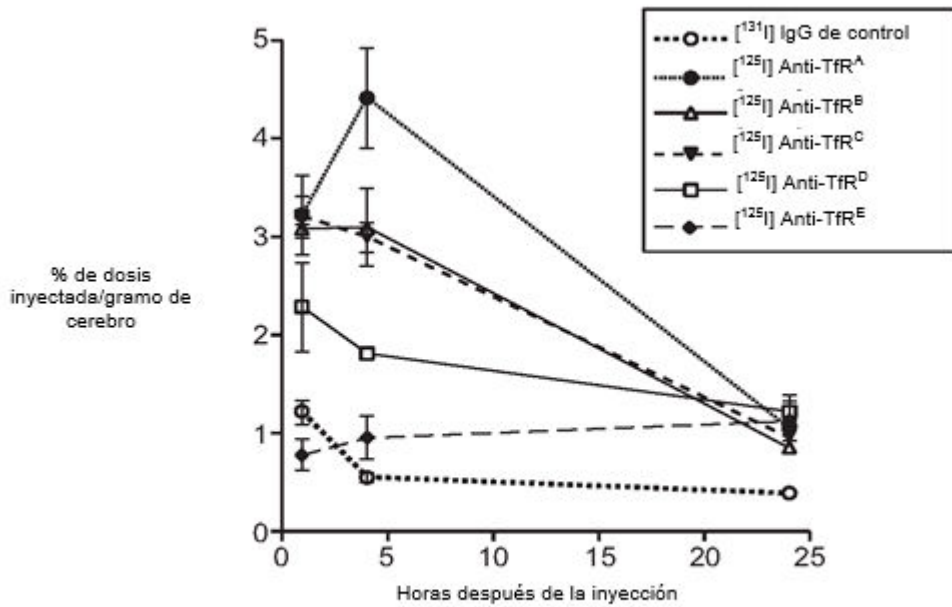
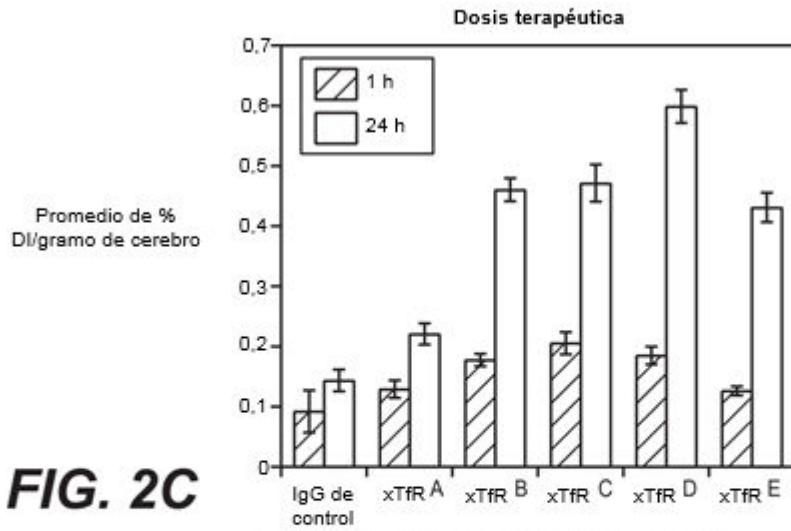
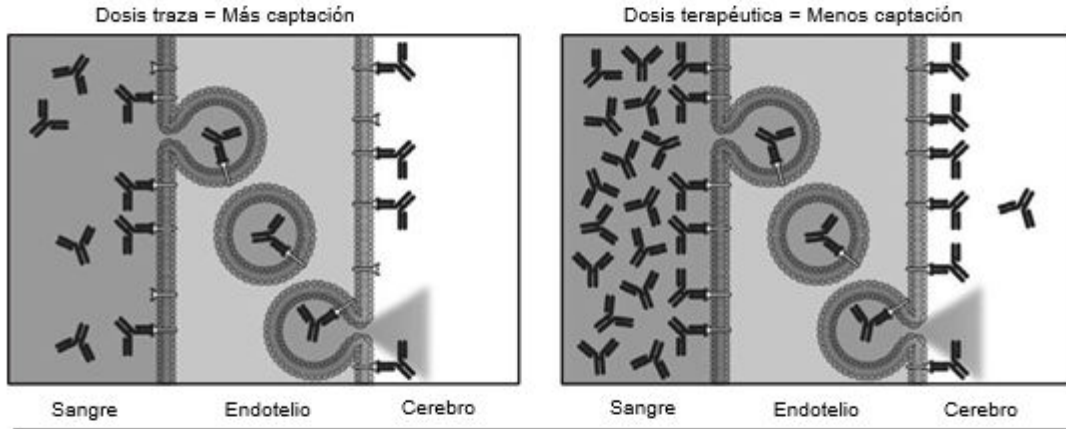


FIG. 2B



Escenario 1: mAb de alta afinidad (Ej. Anti-TfR^A)



Escenario 2: mAb de baja afinidad (Ej. Anti-TfR^D)

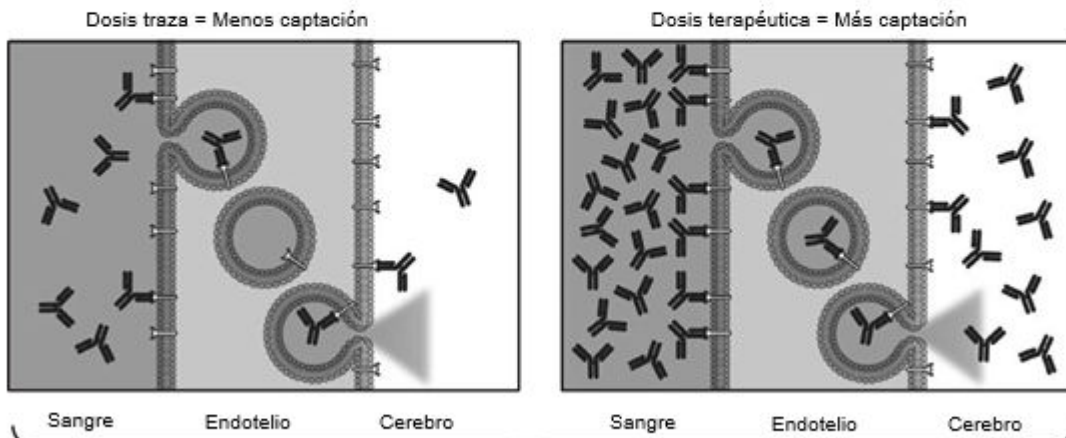


FIG. 2D

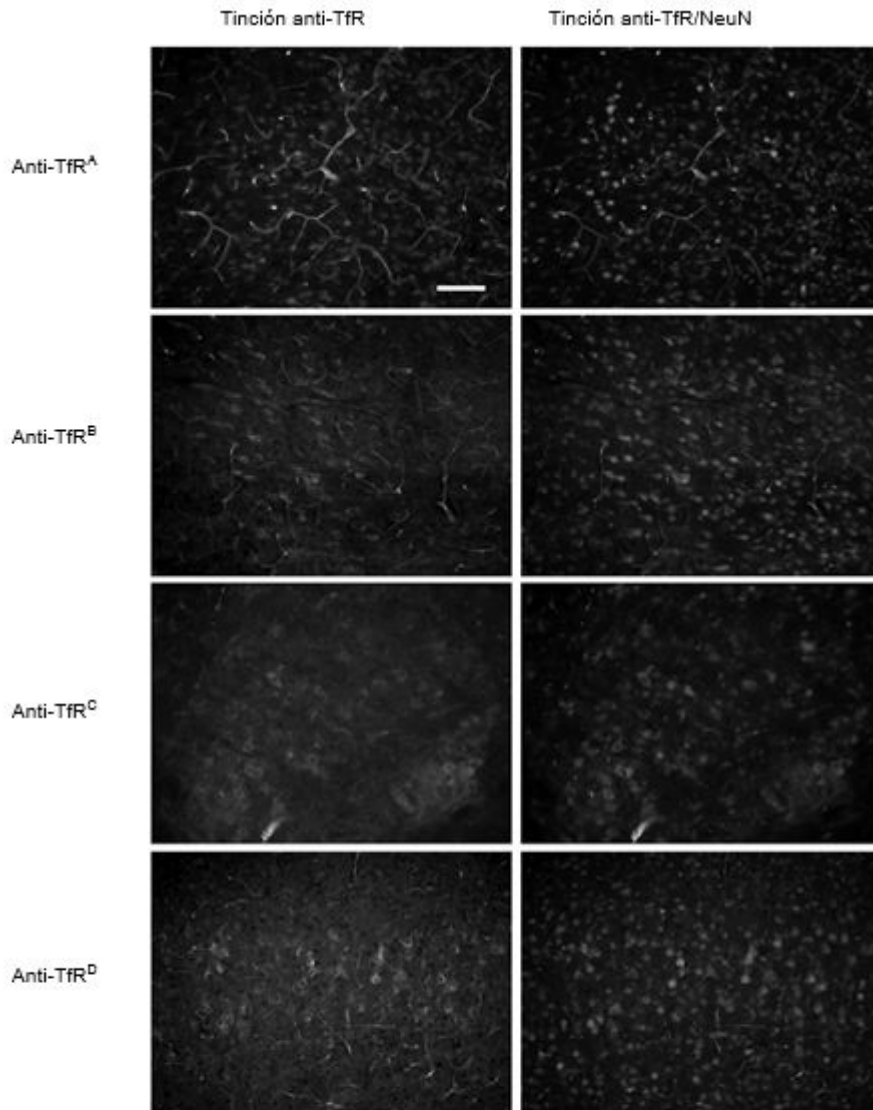


FIG. 2E

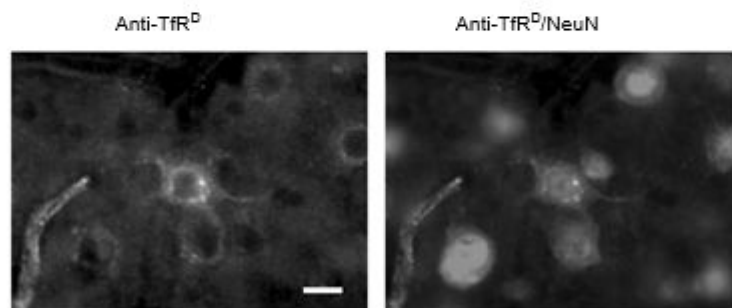


FIG. 2F

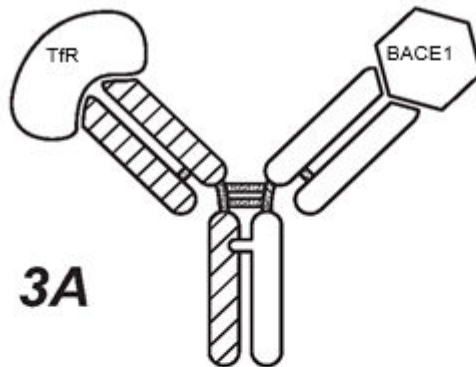


FIG. 3A

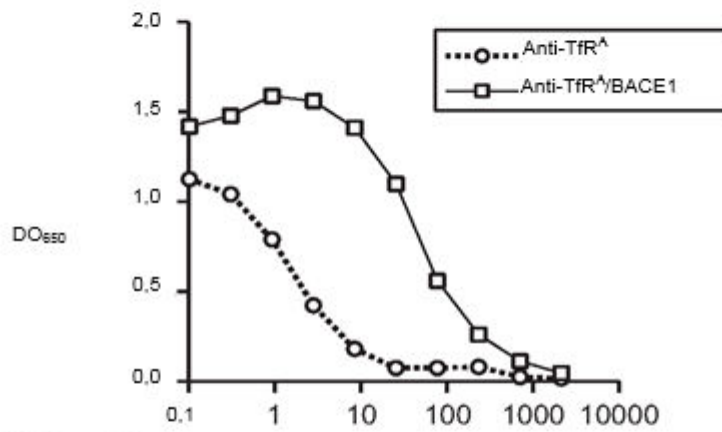


FIG. 3B

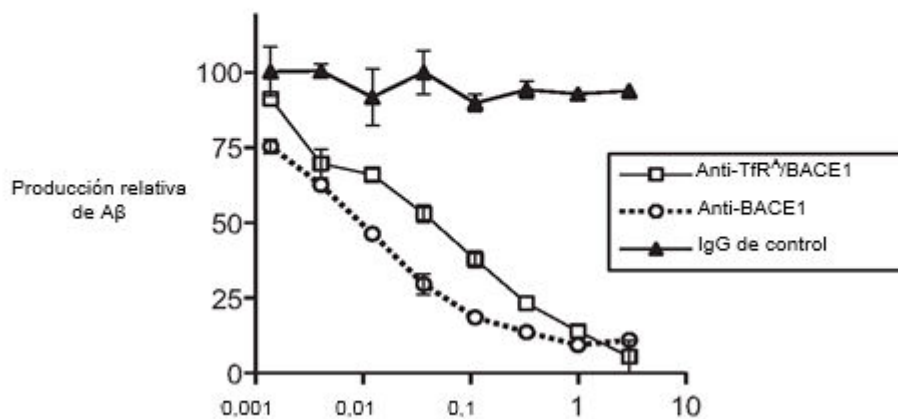


FIG. 3C

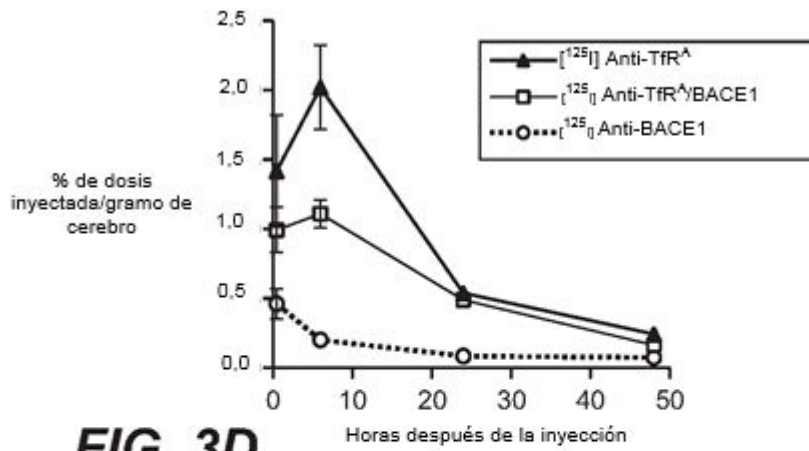


FIG. 3D

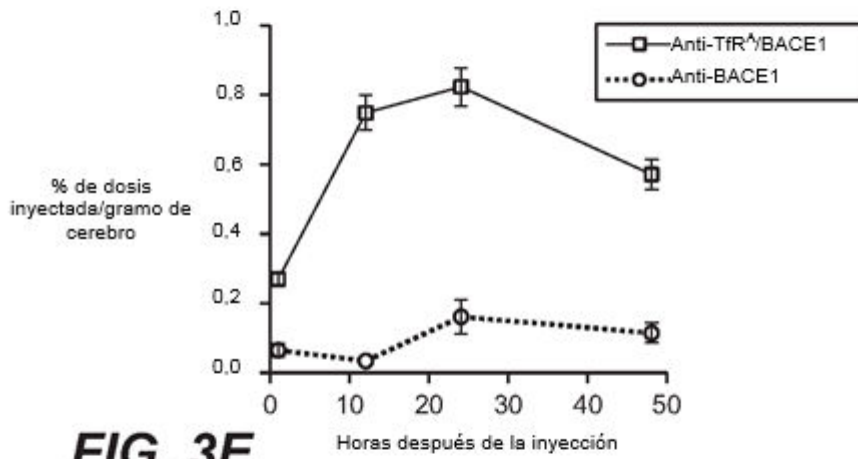


FIG. 3E

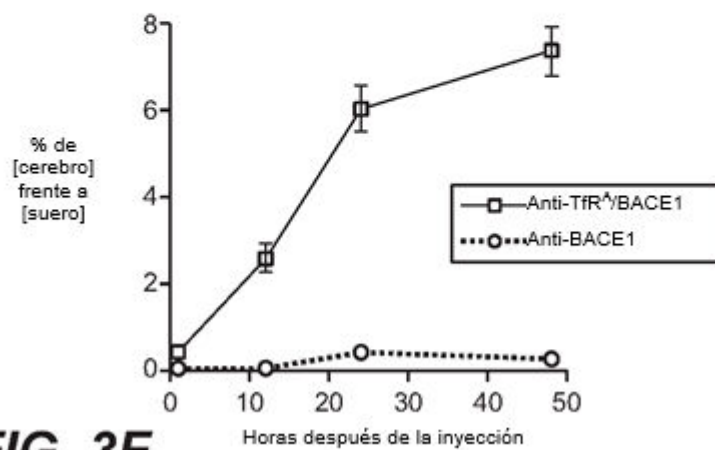


FIG. 3F

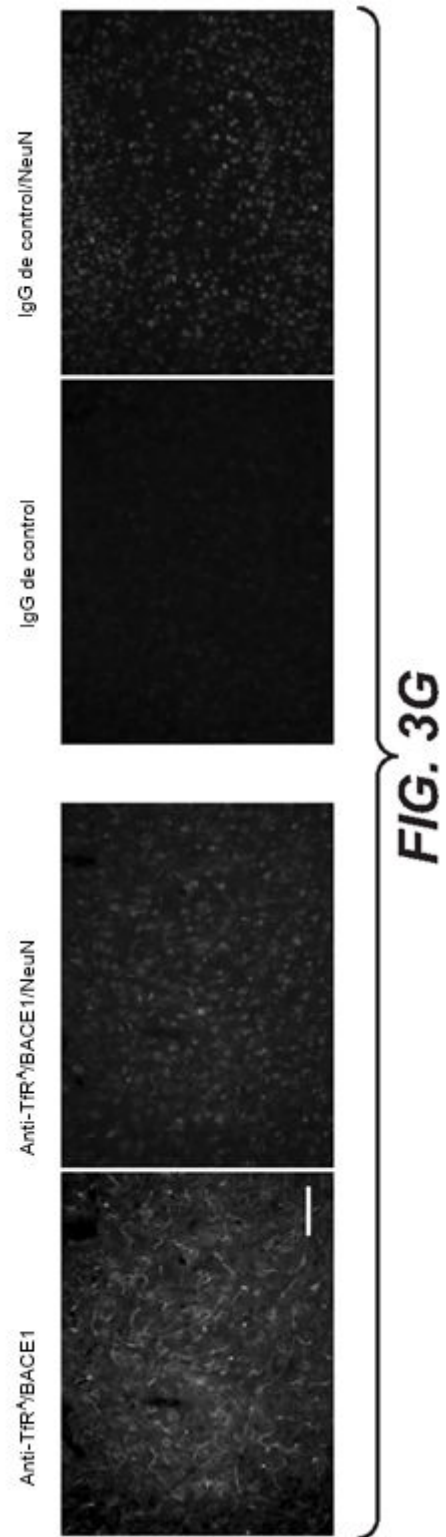


FIG. 4A

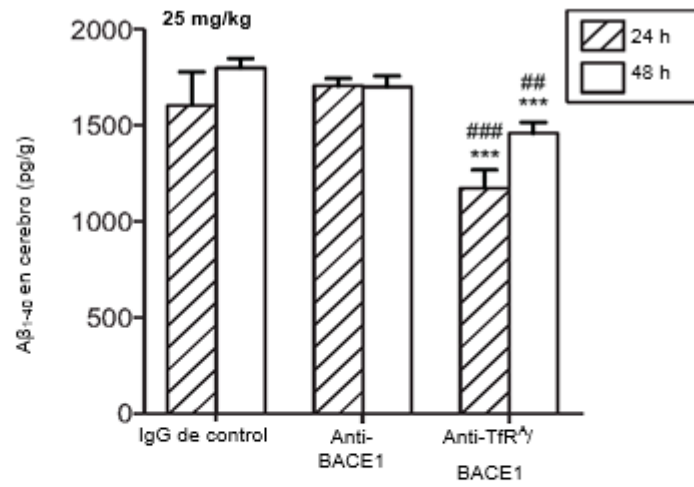


FIG. 4B

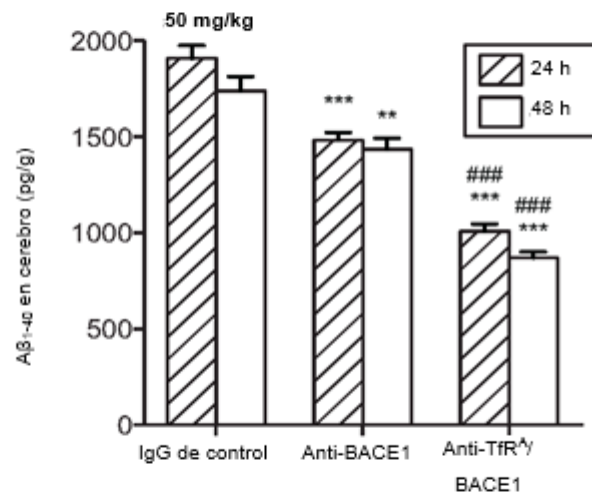


FIG. 4C

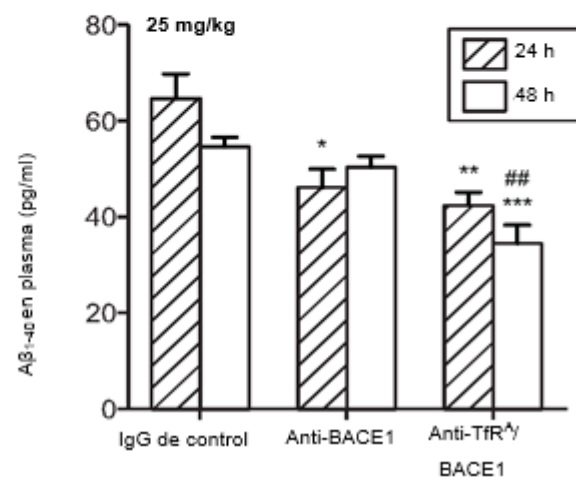


FIG. 4D

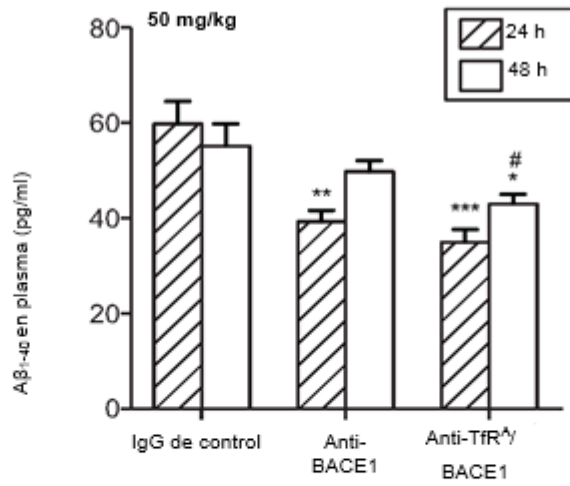
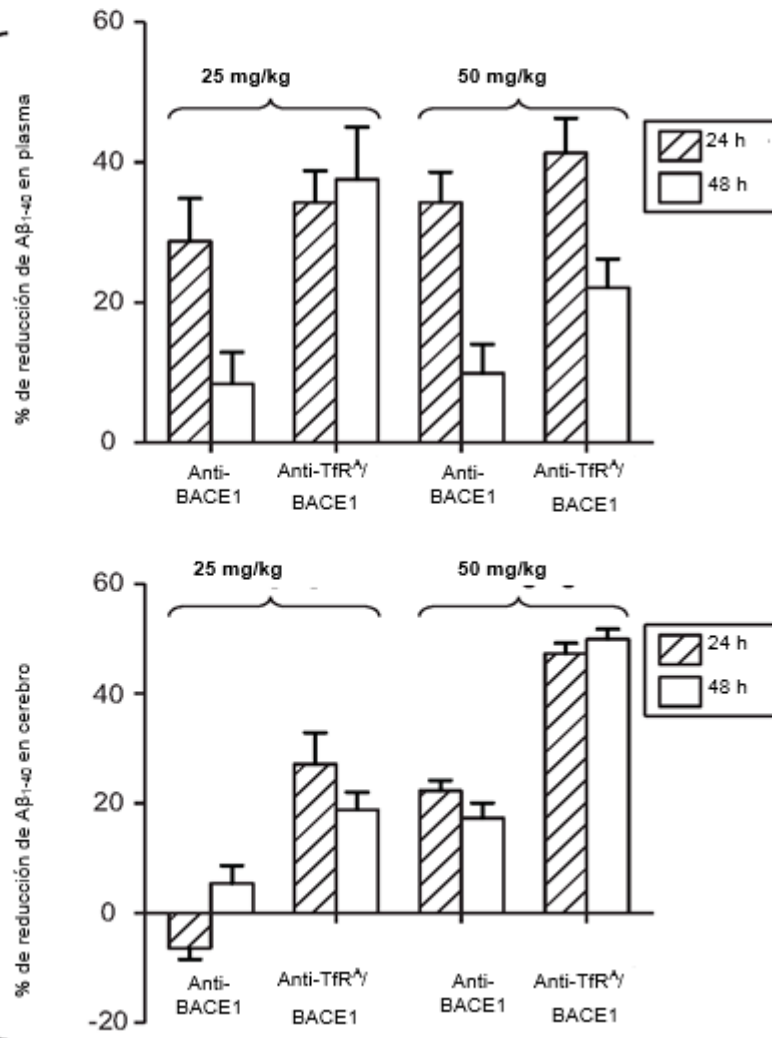


FIG. 4E



Kabat n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
YW412.8	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.31	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.30	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.29	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	V	V	A	N	S	L	A	W	Y	Q						
YW412.8.51	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
Kabat n.º	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
											Kabat - CDR L2										Choithia - CDR L2										Contacto - CDR L2													
YW412.8	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW412.8.31	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW412.8.30	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW412.8.2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW412.8.29	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	L	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW412.8.51	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Kabat n.º	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108																
											Kabat - CDR L3										Choithia - CDR L3										Contacto - CDR L3													
YW412.8	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 1																
YW412.8.31	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 2																
YW412.8.30	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	G	Y	N	D	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 3																
YW412.8.2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	S	S	T	D	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 4																
YW412.8.29	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	D	A	T	S	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 5																
YW412.8.51	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	A	T	D	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 6																

FIG. 5A

Kabat n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
YW412.8	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A								
YW412.8.31	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A								
YW412.8.30	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A								
YW412.8.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A								
YW412.8.29	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A								
YW412.8.51	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A								
Kabat n.º	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78						
YW412.8	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	L	V	Q	P	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A									
YW412.8.31	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	L	V	Q	P	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A									
YW412.8.30	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	L	V	Q	P	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A									
YW412.8.2	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	L	V	Q	P	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A									
YW412.8.29	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	L	V	Q	P	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A									
YW412.8.51	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	L	V	Q	P	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A									
Kabat n.º	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
YW412.8	Y	L	Q	M	S	L	R	A	E	D	T	A	V	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	K	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7								
YW412.8.31	Y	L	Q	M	S	L	R	A	E	D	T	A	V	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	K	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	8								
YW412.8.30	Y	L	Q	M	S	L	R	A	E	D	T	A	V	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	K	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7								
YW412.8.2	Y	L	Q	M	S	L	R	A	E	D	T	A	V	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	K	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7								
YW412.8.29	Y	L	Q	M	S	L	R	A	E	D	T	A	V	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	K	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7								
YW412.8.51	Y	L	Q	M	S	L	R	A	E	D	T	A	V	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	K	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7								

FIG. 5B

Kabat n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	N	Y	Q							
Fab12	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	N	Y	Q							
LC8 IgG	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	N	Y	Q							
LC9 IgG	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	N	Y	Q							
LC10 IgG	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	N	Y	Q							

Kabat n.º	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	S	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Fab12	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	S	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
LC8 IgG	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	S	N	A	S	W	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
LC9 IgG	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	W	Y	A	S	W	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
LC10 IgG	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	W	N	A	S	S	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

Kabat n.º	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108							
	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	S	S	P	P	T	F	G	Q	G	T	X	V	E	I	K	R	S	E	Q	I	D	N	O	:	9
Fab12	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	S	S	P	P	T	F	G	Q	G	T	X	V	E	I	K	R	S	E	Q	I	D	N	O	:	10
LC8 IgG	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	S	S	P	P	T	F	G	Q	G	T	X	V	E	I	K	R	S	E	Q	I	D	N	O	:	11
LC9 IgG	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	S	S	P	P	T	F	G	Q	G	T	X	V	E	I	K	R	S	E	Q	I	D	N	O	:	12
LC10 IgG	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	S	S	P	P	T	F	G	Q	G	T	X	V	E	I	K	R	S	E	Q	I	D	N	O	:	12

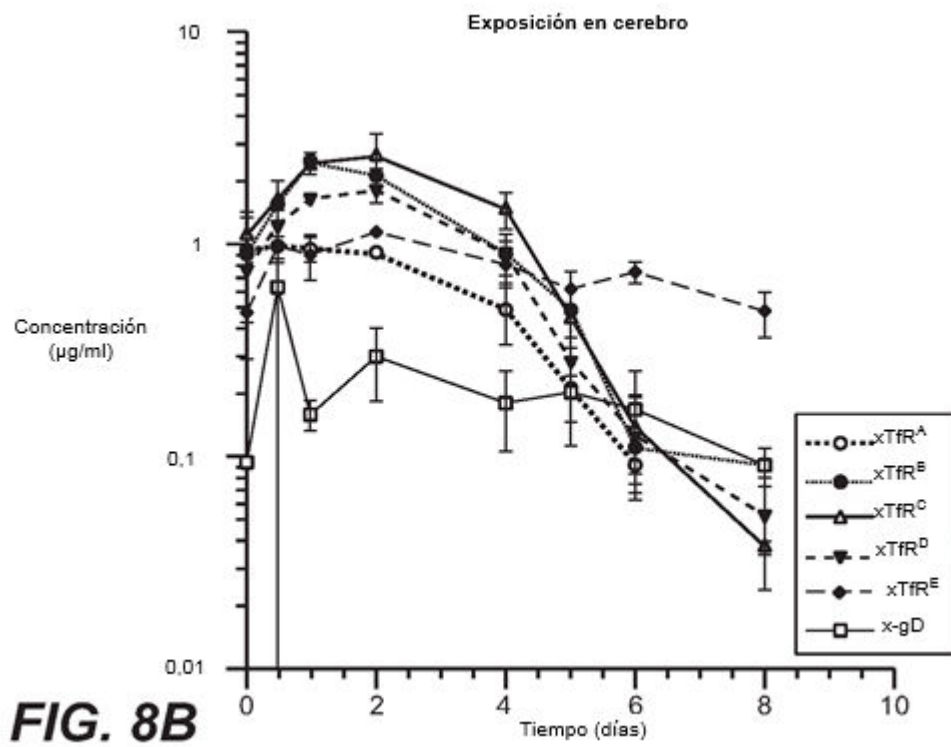
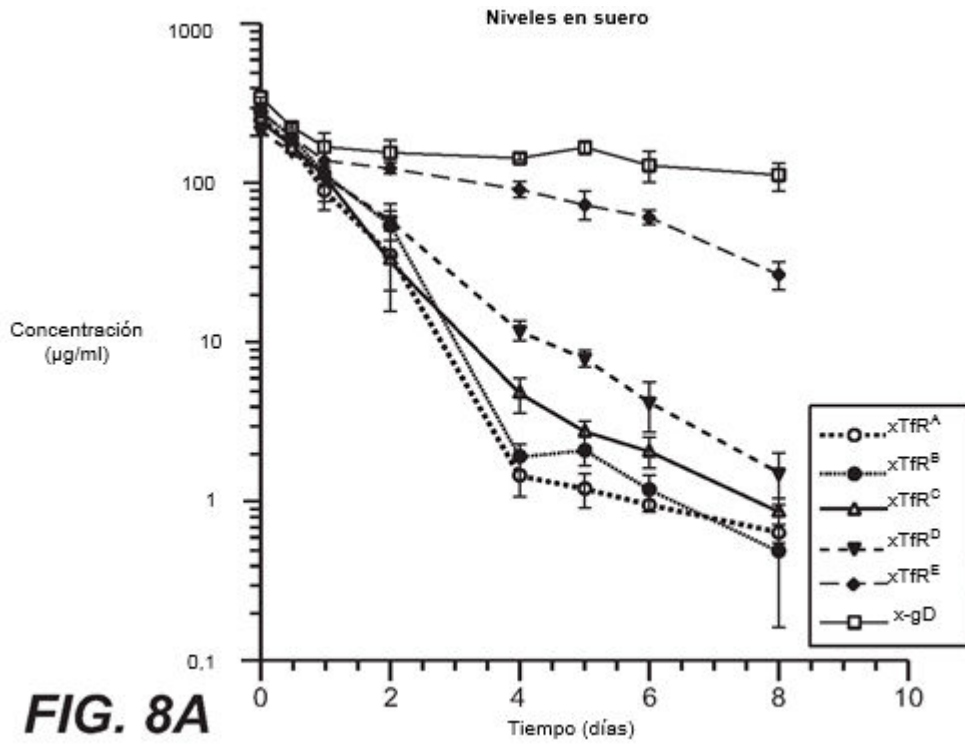
FIG. 6A

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAS
51 INSNGGSTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCASGD
101 YWGQGTFTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT
151 VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT KTYTCNVDHK
201 PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
251 VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV
301 LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM
351 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS
401 RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG (SEQ ID NO: 14)

FIG. 7A

1 DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV YSNGDTYLHW YLQKPGQSPQ
51 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP
101 WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYBREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNREGC (SEQ ID NO: 15)

FIG. 7B



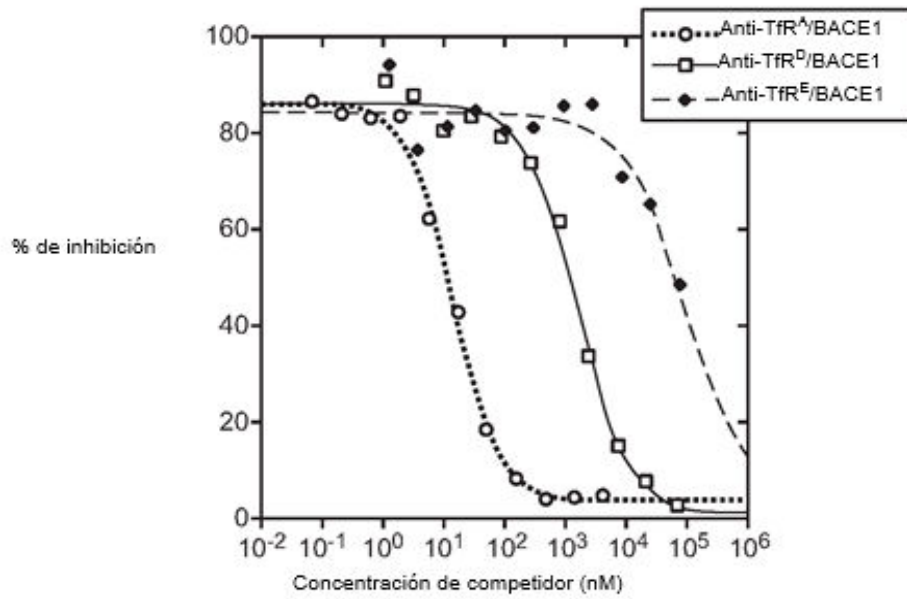


FIG. 9A

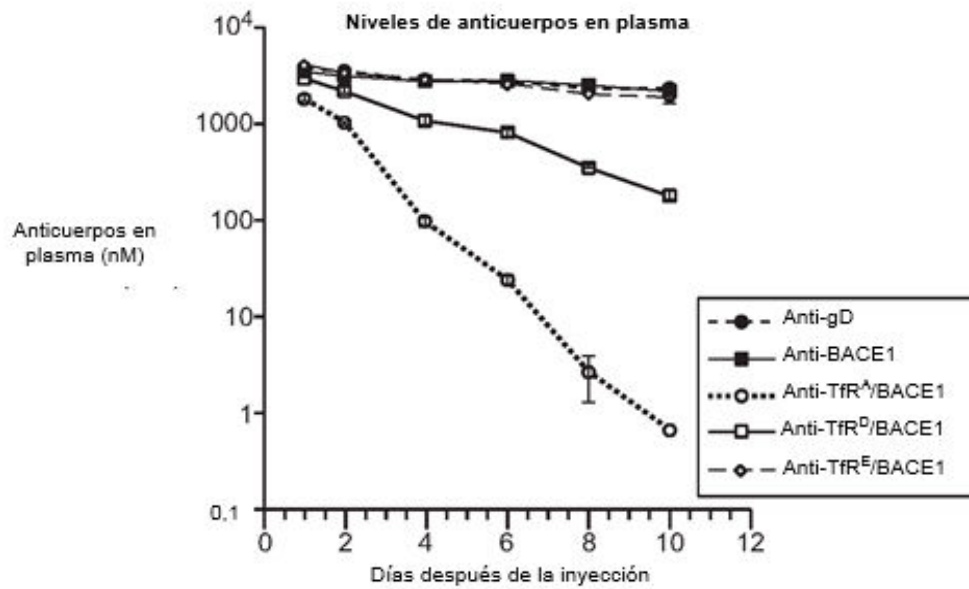


FIG. 9B

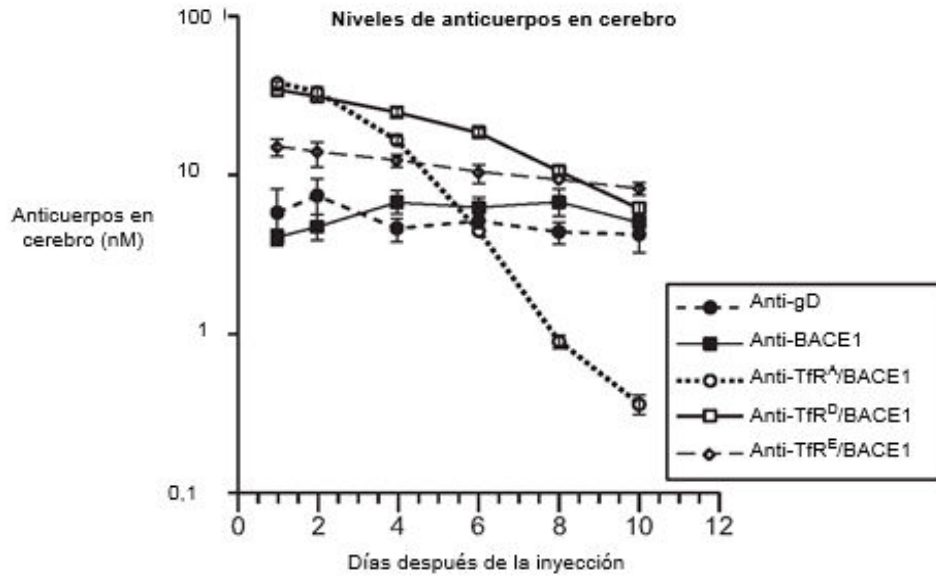


FIG. 9C

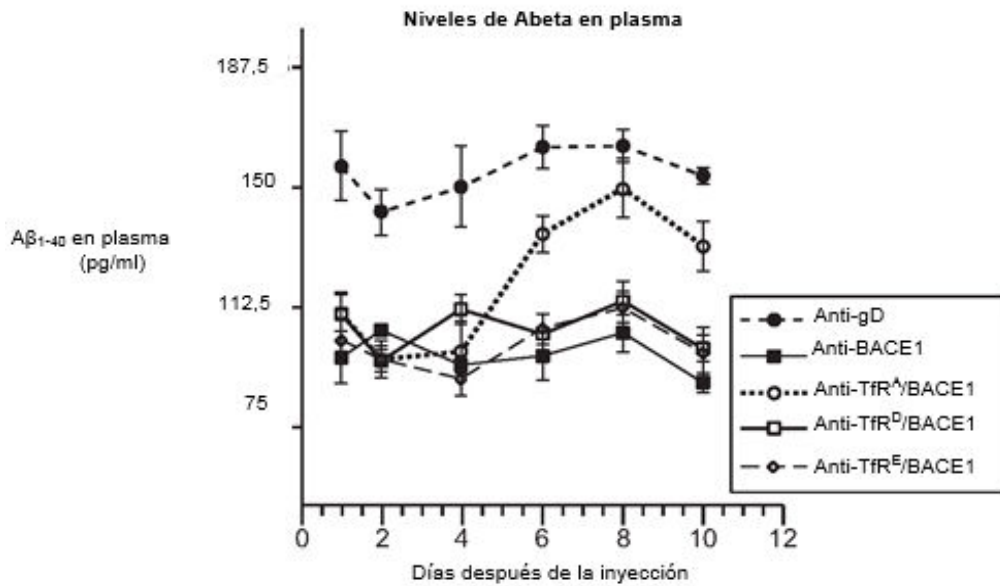


FIG. 9D

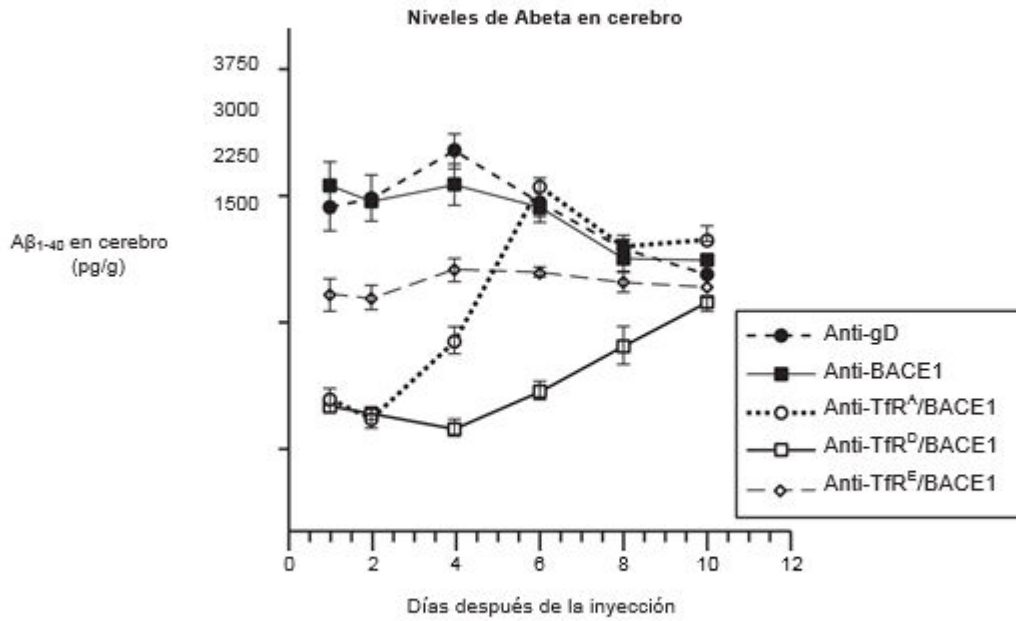


FIG. 9E

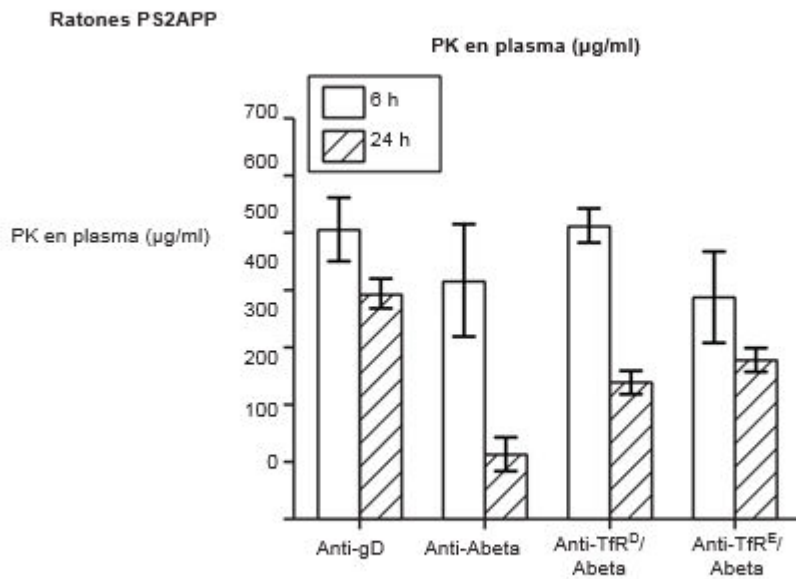


FIG. 10A

