



No. 13-154248- -00004-0000

Fecha: 2015-01-13 16:26:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 30

As. 124.775

Señor

DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

REF: Expediente No. 13 154.248- solicitud de patente de invención a favor de **GENENTECH, INC.** Título: **ANTICUERPOS PARA EL RECEPTOR DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA DE BAJA AFINIDAD Y SUS USOS.**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al Oficio No. 10799 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 2 de Septiembre de 2014.

De manera atenta remitimos a su Despacho un nuevo pliego reivindicatorio que consta de treintaidós (32) reivindicaciones, las cuales se mantienen plenamente soportadas por las divulgaciones del capítulo descriptivo y no exceden en ningún momento el alcance de la invención previamente reivindicada.

En primera instancia, nos permitimos manifestar nuestro total desacuerdo respecto a la objeción que califica como materia no patentable a las reivindicaciones 1 a 29, puesto que la reivindicación 1 y sus respectivas dependientes ilustran un método de transporte de un compuesto que como tal, resulta completamente válido y no recae en ninguna excepción a la patentabilidad.

Como muestra de este hecho, nos permitimos reproducir a continuación la reivindicación 1 de dicho nuevo pliego reivindicatorio:

"Un método de transporte de un compuesto a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer un anticuerpo que se une con baja afinidad al receptor de transferrina (BBB-R), 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."

A partir de dicha caracterización, es evidente que la presente invención se relaciona con un **método de transporte de un compuesto**, que comprende:

- a. Exponer un anticuerpo que presente baja afinidad al receptor de transferrina y que se encuentre acoplado a un compuesto, a la barrera hematoencefálica; y
- b. Transportar el compuesto acoplado al anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica.

Dicho esto, es nuestra intención llamar la atención sobre el hecho de que, a pesar de referirse a un **sistema de entrega de fármaco** cuyo objetivo consiste en lograr el transporte de un fármaco a través de la barrera hematoencefálica, la ejecución del método descrito en dicha reivindicación 1 no implica en ningún momento la aplicación de un método terapéutico o diagnóstico sobre un animal humano, hecho que contrasta con la apreciación del señor Examinador.

En este sentido, afirmamos que la simple mención de la barrera hematoencefálica como diana de interés para el objeto de la presente invención no da lugar a considerar que la misma requiere de un sujeto animal o humano para su ejecución, tal y como el desarrollo de una tableta entérica, por ejemplo, no se relaciona expresamente con la administración de la misma a un sujeto.

Tomando como referencia el caso de una tableta entérica, nos permitimos destacar que esta constituye una estrategia para hacer llegar un fármaco determinado a un blanco puntual, en este caso el intestino, aprovechando los aspectos fisiológicos del

tracto digestivo a través del cual transitaría dicha tableta, y aplicando estrategias puntuales como el recubrimiento con materiales solubles e insolubles bajo condiciones variables de pH.

Similarmente, la presente invención representa un *sistema de entrega de fármaco* que, desde un enfoque biotecnológico, toma ventaja del grado de afinidad de un anticuerpo por un receptor presente en la barrera hematoencefálica para lograr el paso de un compuesto activo acoplado dicho anticuerpo, a través de esta barrera.

A la luz de la anterior comparación, solicitamos sea reconocido que tal y como el desarrollo de una tableta entérica tiene como blanco o diana un órgano tejido específico y aun así representa materia susceptible de patentabilidad, la presente invención no recae en ninguna excepción de patentabilidad y que, por tanto, constituye materia válida que solicitamos sea estudiada de manera pertinente.

Asimismo, insistimos en que si bien el método aquí reivindicado evidencia un mecanismo mucho más complejo que el de la tableta entérica, puesto que su estrategia se fundamenta en aprovechar la relativa afinidad de un anticuerpo para llevar a cabo el transporte de un fármaco acoplado a dicho anticuerpo a través de un tejido puntual, mientras que la tableta únicamente se diseña procurando la desintegración de la misma y disolución y entrega del fármaco en un medio alcalino; la presente invención constituye un *sistema de entrega de fármaco* que en ningún momento implica el diagnóstico o tratamiento de una condición patológica de un individuo animal o humano.

Con base en lo anterior, asumimos demostrado que la invención descrita en la reivindicación 1 y sus respectivas dependientes se ciñe completamente a los requerimientos la Decisión 486, alejándose de las situaciones expuestas en el citado Artículo 20, razón por la que solicitamos respetuosamente se reconozca su patentabilidad y se estudie como parte integral del citado nuevo pliego reivindicatorio que ponemos a su consideración.

En cuanto a las reivindicaciones 2 a 13, 20, 21, 23, y 52 a 54, consideramos que la objeción del señor Examinador es pertinente y por tanto, se llevó a cabo la eliminación de tal materia del actual pliego reivindicatorio.

Más allá de dichas modificaciones, es preciso destacar que el alcance de las reivindicaciones 1, 30 y 38 (nuevas reivindicaciones 1, 14 y 22 respectivamente) fue restringido limitando los posibles receptores de la barrera hematoencefálica al receptor de transferrina (TfR) únicamente, con lo cual se logra una distinción clara de la invención frente al estado de la técnica, como demostraremos más adelante.

Abordando ahora las objeciones de claridad manifestadas en el Oficio técnico, encontramos que la reivindicación 30 fue objetada por no definir alguna etapa o condición específica que deba realizarse según el método reivindicado.

En contraste con dicha apreciación, afirmamos que la reivindicación 30 es válida en la medida que ilustra un **método para producir un anticuerpo** que se caracteriza por comprender las siguientes etapas:

- a. Selección de un anticuerpo específico para un receptor de transferrina (TfR), el cual presenta una deseable baja afinidad por dicho receptor; y
- b. Síntesis del anticuerpo según los métodos y técnicas ya conocidos en el estado de la técnica.

A este respecto cabe anotar que si bien la etapa b. del método en cuestión no se encuentra explícitamente señalada en la reivindicación 30, esta representa materia completamente conocida para cualquier persona medianamente versada en la técnica, quien, a la luz de la materia reivindicada, el capítulo descriptivo y sus propios conocimientos, se encuentra en la capacidad de inferir la secuencia de pasos relacionados con la síntesis de un anticuerpo. puede inferir la secuencia

Debido a que dicha secuencia de etapas de síntesis (i) ya es conocida y aplicada y (ii) no aportaría ningún elemento distintivo a la presente invención, afirmamos que la misma es evidente para el versado en la materia y por tanto, no es necesario especificarla en la objetada reivindicación 30.

Como sustento de lo dicho, citamos a continuación un fragmento del Instructivo de Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de Utilidad, en donde se define qué tipo de información debe contener una reivindicación:

“Las reivindicaciones deben contener todas las características técnicas esenciales de la invención las cuales definen la invención y la hacen (o deberían hacerla) diferente del estado de la técnica y, por tanto, constituyen la solución al problema técnico que intenta resolver la invención.” (Numeral 2.6.1 – Contenido de las reivindicaciones)

Adicional a lo ya comentado, nos permitimos expresar que el concepto inventivo del método reivindicado se centra precisamente en la selección de un anticuerpo de dichas características para que el mismo sea útil para transportar un compuesto activo a través de la membrana hematoencefálica, por lo cual es evidente que la secuencia de síntesis como tal no representa un atributo característico y distintivo de la presente invención que deba ser reivindicado.

Por otro lado, afirma el señor Examinador que, tanto el método de dicha reivindicación 30 como el anticuerpo de las reivindicaciones subsecuentes, se encuentra caracterizado por un “resultado a alcanzar” que no es aceptable.

Frente a esto, es oportuno mencionar que la afinidad del anticuerpo por el receptor, el tipo de receptor y el antígeno al cual se une, representan **parámetros y requisitos técnicos** de la invención que deben ser cumplidos por la misma a fin de solucionar exitosamente el problema técnico objetivo al cual se enfrenta.

Puntualmente, es de notar que la afinidad del anticuerpo por el receptor determina la capacidad de unión del mismo a su ligando, garantizando la interacción de los mismos. Una alta afinidad indica que la unión del anticuerpo por el receptor es fuerte y tiende a permanecer, mientras que una baja afinidad indica que tal unión no es muy fuerte y tiende a disociarse.

Para el presente caso, resulta esencial que el anticuerpo pueda unirse al receptor de transferrina pero que dicha interacción no sea permanente pues la intención es únicamente transportar una molécula acoplada, la cual será liberada una vez la unión entre el anticuerpo y el receptor haya cesado.

Teniendo en cuenta lo anterior, es claro que la baja afinidad del anticuerpo por el receptor de transferrina no constituye un "resultado a alcanzar" sino un **requisito técnico** sin el cual la invención fallaría completamente en resolver el problema técnico, ya que si la unión de dicho anticuerpo al receptor fuera fuerte o permanente, el transporte de la molécula acoplada al mismo no sucedería.

De igual manera, afirmamos que la afinidad de un anticuerpo por determinado receptor representa un **parámetro** por cuanto puede ser cuantificado o medido aplicando técnicas ampliamente extendidas en el campo técnico, como las mencionadas en el siguiente fragmento, las cuales también hacen parte del conocimiento general del versado en la materia:

"En un aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide utilizando análisis de scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide utilizando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto se mide utilizando competición ELISA."

Adaptado del capítulo descriptivo de la presente solicitud

En concordancia con lo anterior, solicitamos sea reconocido que la afinidad del anticuerpo de la presente invención constituye un **parámetro** cuya validez se encuentra avalada por los lineamientos del Instructivo de Patentabilidad (Numeral 2.6.5.9 - Definición por parámetros, página 42) y que por tanto, caracteriza apropiadamente la presente invención.

Con relación al tipo de receptor y al antígeno al cual se une el anticuerpo reivindicado, agregamos que los mismos restringen pertinentemente el alcance de la presente invención al delimitar de modo concreto los ligandos del anticuerpo reivindicado y por tanto, no dan lugar a los "resultados a alcanzar" que indica el señor Examinador.

En vista de lo anterior, solicitamos sea reconocida la total pertinencia de los parámetros y requisitos técnicos reivindicados, dado que estos no indican supuestos resultados a alcanzar, sino que contrario a esto, constituyen materia que define de manera válida la presente invención.

Igualmente, solicitamos de manera respetuosa sean retiradas las objeciones que cuestionan la claridad de la reivindicación 30, la cual hemos demostrado divulga de manera adecuada el alcance de la presente invención.

Ahora bien, encontramos que el señor Examinador también objeta la descripción de la presente solicitud por no divulgar la invención de manera suficientemente completa para que la persona del oficio normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla, y porque la misma no ilustra ningún método para producir anticuerpos monoclonales.

Contrario a esa observación, consideramos que las enseñanzas del capítulo descriptivo son claras, suficientes y permiten la plena comprensión de la presente invención, además de su ejecución, razón por la que no justificamos la objeción del señor Examinador.

En este sentido, presentamos a continuación un fragmento del capítulo descriptivo referente a los métodos indicados para producir anticuerpos monoclonales:

"En un aspecto, el anticuerpo es seleccionado de un panel de anticuerpos con base en la afinidad del anticuerpo seleccionado. En otro aspecto, el anticuerpo está manipulado genéticamente para tener la afinidad. En uno de tales aspectos, el anticuerpo es generado utilizando cualquier metodología conocida en el arte de ingeniería de proteínas, que incluye, pero sin limitación, expresión en fagos, expresión en levaduras, mutagénesis aleatoria y mutagénesis sitio dirigida."

Adaptado del capítulo descriptivo de la presente solicitud

Según indica la presente divulgación, y en concordancia con lo ya comentado, la metodología aplicada para la síntesis o producción de los anticuerpos de la presente invención corresponde a cualquiera de las conocidas y aplicadas en la actualidad, entre ellas las mencionadas **expresión en fagos, expresión en levaduras, mutagénesis aleatoria y mutagénesis sitio dirigida**, por lo que la ejecución de la presente invención es perfectamente posible a partir de la información consignada en el capítulo descriptivo acompañada de los conocimientos propios del versado en la materia.

Dicho esto, solicitamos respetuosamente sea retirada la objeción que perjudica al capítulo descriptivo de la presente solicitud, reconociendo de esta manera la validez del mismo.

Novedad y Nivel inventivo

La materia de las reivindicaciones 30 y 38 (nuevas reivindicaciones 14 y 22) se ve anticipada por las divulgaciones del documento D1 titulado *"Drug Targeting of Erythropoieyin Across the primate Blood-Brain wuith an IgG Molecular trojan Horse"* (Journal of pharmacology and experimenal therapeutics, Vol. 333, no 3, 1 Junio 2010, Páginas 964-969).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el alcance del actual pliego reivindicatorio fue limitado especificando que tanto el método de transporte de un compuesto a través de la barrera hematoencefálica (reivindicación 1) como el método para producir un anticuerpo (nueva reivindicación 14) se orientan al desarrollo de un anticuerpo (nueva reivindicación 22) que se une puntualmente al **receptor de transferrina TfR**.

Considerando dicha modificación, es nuestra intención destacar que la referencia citada por el señor Examinador presenta un enfoque totalmente distinto al de la presente invención pues divulga un anticuerpo específico de membrana HIRMAb que no se relaciona en absoluto con el objeto y sentido de la materia ahora reivindicada.

Asimismo, el documento D1 no brinda ninguna noción respecto a la **afinidad del anticuerpo por el receptor**, la cual representa un parámetro decisivo de la presente invención que equivale, en consecuencia, a una característica técnica esencial válida y que permite diferenciar aún más la materia reivindicada del estado de la técnica.

Debido a que la anterioridad citada por el señor Examinador falla completamente en anticipar todas y cada una de las características técnicas esenciales que dan origen a la presente invención, solicitamos respetuosamente sea retirada la objeción que cuestiona su novedad.

En conexión con lo anterior, en defensa ahora del nivel inventivo de la presente invención, reiteramos que la deseable baja afinidad del anticuerpo y métodos relacionados define la **unión transitoria del anticuerpo al receptor**, gracias a la cual se prevé la disociación del complejo anticuerpo-receptor una vez atravesada la barrera hematoencefálica, dando lugar finalmente a la liberación del compuesto de interés acoplado al anticuerpo.

Puesto que el documento D1 no anticipa ni sugiere de ninguna manera dicha estrategia, en torno a la cual gira el concepto inventivo de la presente invención y se logra solucionar el problema técnico objetivo, afirmamos que este tampoco logra desvirtuar el nivel inventivo de la materia aquí reivindicada.

Inclusive, consideramos que si el versado en la materia tomara como punto de partida las enseñanzas del citado documento D1, este se orientaría al desarrollo de **anticuerpos de membrana HIRMAb** que como tal, se aleja de la naturaleza y funcionalidad de la presente invención.

Partiendo de que la anterioridad en estudio, en lugar de instruir o motivar los aspectos característicos de la presente invención, pone a disposición de la materia información inespecífica y alejada de la misma, concluimos que no hay lugar a atribuirle obviedad a ninguna de las reivindicaciones del actual pliego reivindicatorio en vista de tales enseñanzas.

Así pues, es preciso destacar que además de cumplir cabalmente con los requisitos de patentabilidad, la presente invención implica claros **beneficios y ventajas** que son evidentes dado el contexto técnico en que se desarrolla, situación que procedemos a exponer.

Como primera medida, llamamos la atención sobre el reto farmacéutico que implica el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica, ya que como bien reconocerá el versado en la materia, esta membrana parenquimatosa representa un obstáculo difícil de sortear cuando se trata de dirigir un fármaco hacia el interior del tejido cerebral.

Concretamente, la barrera hematoencefálica constituye una membrana de protección que permite únicamente el paso de moléculas pequeñas –como gases, azúcar, etanol y similares– al interior de la corteza cerebral, impidiendo de este modo la acumulación de desechos o la infección de la misma por parte de agentes nocivos.

En este contexto, el desarrollo de la presente invención constituye un claro adelanto en la materia porque proporciona un método de transporte, método de síntesis y un anticuerpo que se fundamenta en la unión transitoria de un anticuerpo al receptor de transferrina (TfR) presente en la barrera hematoencefálica, logrando así llevar una molécula hacia el interior de la corteza cerebral a través de dicha barrera hematoencefálica.

Adicionalmente, vale la pena destacar que el objeto de la presente solicitud no se limita únicamente a proponer un sistema de entrega de fármacos innovador, sino que la misma ha demostrado **efectos técnicos inesperados** al incrementar la absorción del fármaco acoplado al anticuerpo en el cerebro empleando anticuerpos de menor afinidad por el receptor de transferrina, hecho que solicitamos sea tenido en cuenta en complemento de la argumentación precedente como un indicio adicional de nivel inventivo.

Para sustentar lo anterior, nos permitimos reproducir a continuación la Tabla 2 del capítulo descriptivo, la cual ilustra una serie de anticuerpos de afinidad variable por el

receptor de transferrina (TfR), los cuales fueron debidamente ensayados en el desarrollo de la presente invención:

Tabla 2: mediciones IC50 para anticuerpos anti-TfR
Adaptado del capítulo descriptivo de la presente solicitud

Anticuerpo	IC50 (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	-

De la información consignada en la anterior Tabla destacamos que el anticuerpo anti-TfR^A fue aquel que presentó la mayor afinidad por el receptor de transferrina, y en consecuencia, la **menor IC50** comparado con los demás anticuerpos ensayados. Este aspecto resulta de vital importancia debido a que allí radica la sorpresa derivada de los siguientes hallazgos experimentales.

El primer ensayo llevado a cabo consistió en la inyección por vía intravenosa de una dosis traza aproximadamente 50 µg/kg) de dichas variantes [¹²⁵I]anti-TfR^{A,B,C,D,E} (variantes luego de 5 min, 1, 4, 6 y 24 horas (n=3), el cual permite llevar a cabo la cuantificación de la captación cerebral promedio, es decir, la cuantificación del fármaco acoplado al interior de la corteza cerebral.

Los resultados de este ensayo se exponen en la siguiente Figura 2B, la cual presenta datos de un experimento individual en el cual el total de las cinco variantes anti-TfR fueron evaluadas por separado:

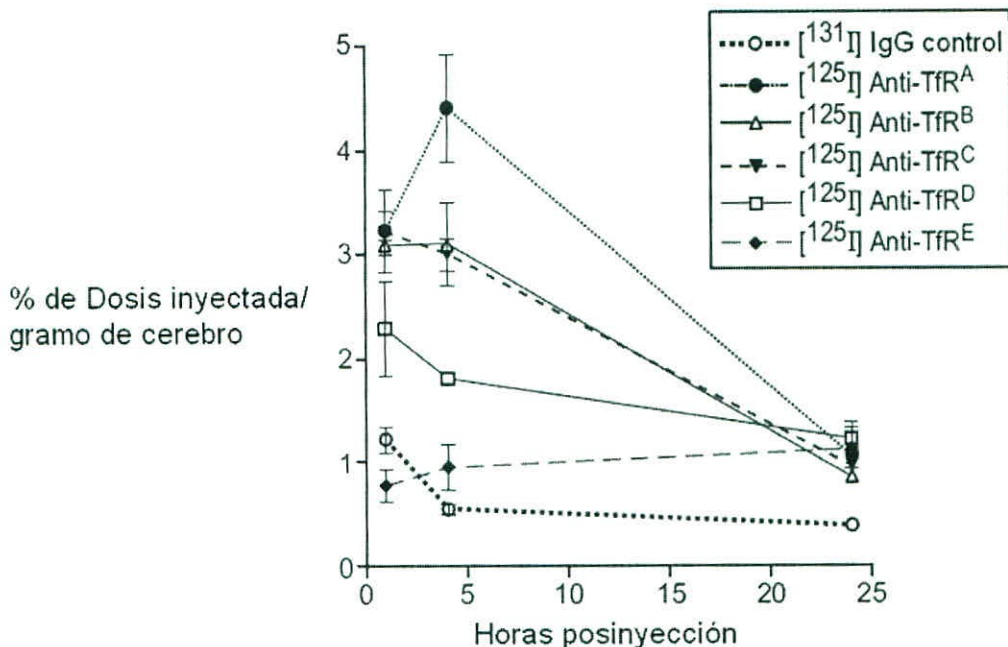


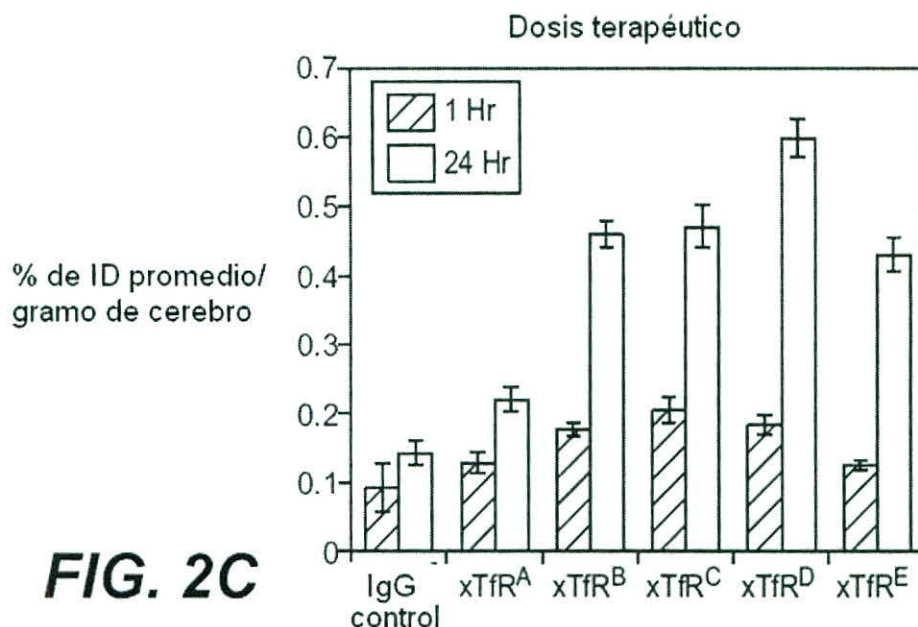
FIG. 2B

Adaptada del capítulo descriptivo de la presente solicitud

Tal y como evidencia la anterior Figura, los niveles de dosis traza a nivel de la corteza cerebral relacionados con los anticuerpos anti-TfR de menor afinidad fueron inferiores en comparación con los niveles logrados por las variantes que demostraron mayor afinidad de unión, como es el caso del anticuerpo marcado [¹²⁵I]anti-TfR^A.

A partir de estos resultados, se esperaría que, teóricamente, el uso de anticuerpos de mayor afinidad resultara en una mejor entrega del fármaco a través de la barrera hematoencefálica, esperando entonces una acumulación deficiente del fármaco acoplado a aquellos anticuerpos de baja afinidad de unión.

Sin embargo, tras realizar un segundo ensayo empleando dosis terapéuticas en lugar de dosis traza, se encontró sorprendentemente que **las mismas variantes con baja afinidad de unión al receptor de transferrina demostraron una mayor absorción del fármaco a nivel cerebral pasadas 24 horas de la administración**, pese a que no se detectaran cambios apreciables tras pasar la primera hora de dicho ensayo. Los datos recopilados de este ensayo se exponen con mayor claridad en la siguiente Figura 2C:



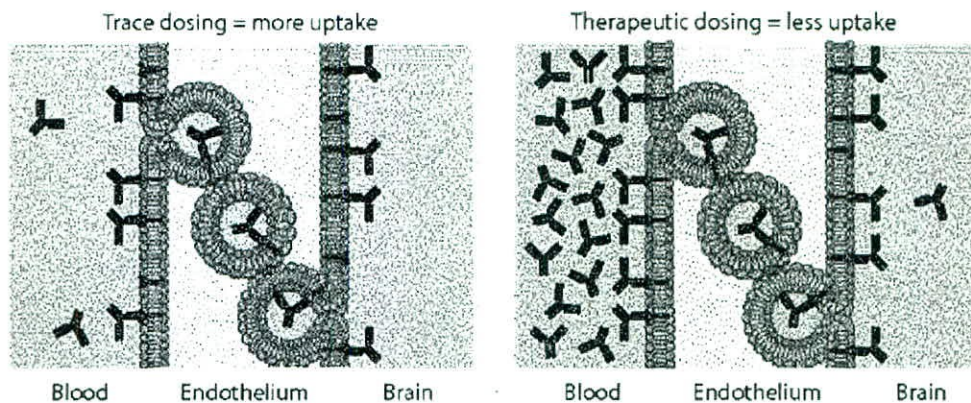
Adaptada del capítulo descriptivo de la presente solicitud

A partir de este comportamiento se propuso un modelo que sugiere que los anticuerpos con baja afinidad se unen a los receptores presentes en el lado luminal de la vasculatura de la barrera hematoencefálica, en donde exponen concentraciones no-saturadas que derivan en una baja absorción endotelial del fármaco.

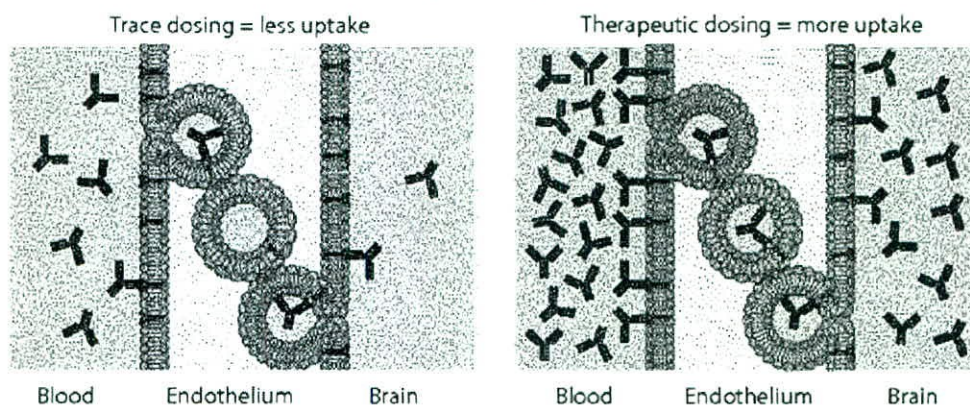
Sin embargo, cuando se maneja una dosis superior, es decir una dosis terapéutica, los receptores luminales se saturarían independientemente de la afinidad de los anticuerpos por los mismos, resultando en una absorción endotelial similar.

Dada dicha condición, **los anticuerpos que manifiestan más baja afinidad pueden alcanzar una mayor acumulación a nivel cerebral** debido a que se maximiza la disociación de la diana molecular, facilitando la liberación al interior del tejido cerebral y reduciendo también la probabilidad de que haya eflujo fuera del cerebro, lo cual se puede apreciar de mejor manera en el siguiente esquema extraído del artículo de Yu *et al.* (Sci Transl Med 3, 84ra44 (2011) que anexamos al presente memorial:

High-affinity antibody (anti-TfR^A)



Low-affinity antibody (anti-TfR^D)



Adaptado de Anexo 1 – Yu *et al.* (Sci Transl Med 3, 84ra44 (2011); Figura 3)

A la luz de este esquema, es posible apreciar que en el caso de los anticuerpos que gozan de baja afinidad, existe una distribución muy favorable de los mismos al interior de la barrera hematoencefálica, es decir, a nivel del tejido cerebral, gracias a que las concentraciones se encuentran limitadas y confinadas en el lado parenquimal de la barrera hematoencefálica; siendo este un **fenómeno sorprendente e inesperado** que además, contrasta con las expectativas derivadas de la experimentación con dosis traza.

Adicionalmente, cabe resaltar que el citado Anexo 1 (Yu *et al.* Sci Transl Med 3, 84ra44 (2011)) corresponde a uno de los artículos científicos publicados posterior a la presente divulgación, profundizando en dicha estrategia que como tal, no tiene ningún precedente en el arte previo y en torno a la cual radica su importancia en el contexto técnico expuesto, ya que da a conocer un **sistema de entrega de fármacos** a través de la barrera hematoencefálica eficaz y mejorado que garantiza la liberación de una molécula activa en el sitio indicado.

Más allá de este hecho, solicitamos sea tenido en cuenta que el capítulo descriptivo de la presente solicitud reporta adecuadamente los **efectos sorprendentes e inesperados** que acompañan al objeto de la presente solicitud, según revela el siguiente fragmento:

“Sorprendentemente, la disminución de la afinidad por el BBB-R aumenta la captación del cerebro y la distribución, con un cambio robusto observado en la localización de la vasculatura a las neuronas y neurópilo asociado distribuido dentro del SNC. En segundo lugar, se propone la afinidad más baja del anticuerpo por la BBB-R para afectar la capacidad del anticuerpo para retornar al lado vascular de la BBB a través del BBB-R desde el lado del SNC de la membrana, porque la afinidad global del anticuerpo por el BBB-R es baja y la concentración local del anticuerpo en el lado del SNC de la BBB no es de saturación debido a la rápida dispersión del anticuerpo en el compartimento del SNC. En tercer lugar, in vivo, y como se observa para el sistema Tfr, los anticuerpos de menor afinidad por el BBB-R no son limpiados del sistema tan eficientemente como aquellos de mayor afinidad por el BBB-R, permaneciendo así a mayores concentraciones de circulación que sus homólogos de alta afinidad. Esto es ventajoso debido a que los niveles de anticuerpo en circulación del anticuerpo de baja afinidad se mantienen en niveles terapéuticos durante un período de tiempo más largo que los del anticuerpo de alta afinidad, lo cual, por consiguiente, aumenta la captación de anticuerpo en el cerebro por un período más largo de tiempo. Además, este aumento tanto en plasma como en exposición del cerebro puede reducir la frecuencia de dosificación en la práctica clínica, lo cual tiene beneficios potenciales no solamente para la conformidad y conveniencia del paciente sino también para disminuir cualquier efecto secundario potencial, o efectos fuera de objetivo, del anticuerpo y/o de un compuesto terapéutico acoplado al mismo.”

Adaptado del capítulo descriptivo de la presente solicitud

De acuerdo con esto, solicitamos sea reconocido que la presente invención evidencia una serie de indicios adicionales de nivel inventivo que ratifican el cumplimiento de dicho requisito y que demuestran que la misma implica claros **beneficios y ventajas** en comparación con las divulgaciones del estado de la técnica.

Luego entonces, concluimos que uno de los aportes de la presente invención –quizás el más valioso– se traduce en que ***los anticuerpos con baja afinidad por el receptor de transferrina (TfR), cuando son administrados en dosis terapéutica, alcanzan concentraciones y una favorable acumulación parenquimal***, lo cual no habría podido ser previsto por el versado en la materia pues contrasta francamente con las expectativas derivadas de los conocimientos técnicos habituales y la experimentación previa.

Puesto que el documento D1 no brinda ninguna orientación al respecto, ni remotamente proporciona una solución como la provista por la presente invención para lograr el transporte de un fármaco acoplado a un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica, solicitamos sea reconocida la plena patentabilidad de la presente invención pese a las divulgaciones de dicha anterioridad.

Asimismo, solicitamos sea reconocido que el estado de la técnica definido por el documento D1 no proporciona información relevante, instrucciones o motivación para que una persona normalmente versada en la materia se vea en capacidad de alcanzar el objeto de la presente solicitud de manera obvia o en todo caso, sin hacer uso de su propia habilidad inventiva, razón por la cual esta divulgación es completamente meritoria del privilegio de patente que aquí se solicita.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la Decisión 486.

Anexos

Nuevo pliego reivindicatorio.

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.S.J.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1. Un método de transporte de un compuesto a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer un anticuerpo que se une con baja afinidad al receptor de transferrina (BBB-R), 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.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μ M.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el IC50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μ M.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μ M.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μ M.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μ M.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo acoplado al compuesto tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μ M.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a transferrina.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto opcionalmente forma una porción del anticuerpo multiespecífico.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión al antígeno que une el BBB-R y un segundo sitio de unión al antígeno que une un antígeno cerebral.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el antígeno cerebral es seleccionado del grupo que consiste en beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), quinasa de repeticiones ricas en leucina 2 (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma secretasa, receptor de muerte 6 (DR6), proteína precursora del amiloide (APP), receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), y caspasa 6.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el anticuerpo multiespecífico une TfR y BACE1.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el anticuerpo multiespecífico une TfR y Abeta.

14. Un método para producir un anticuerpo útil para transportar un compuesto a través de la BBB, que comprende seleccionar un anticuerpo específico para un receptor de la barrera hematoencefálica (BBB-R) porque tiene una deseable baja afinidad por el BBB-R, en donde dicho receptor de la barrera hematoencefálica es un receptor de transferrina (TfR).

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la afinidad por el BBB-R es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μ M.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo tiene un IC50 de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μ M.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo es seleccionado a partir de un panel de anticuerpos con base en la afinidad del anticuerpo seleccionado.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo está diseñado para tener la afinidad.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 14, el cual comprende acoplar el anticuerpo con un compuesto terapéutico.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el compuesto

terapéutico es un fármaco para trastornos neurológicos.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende producir un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que une el BBB-R y un segundo sitio de unión al antígeno que une un antígeno cerebral.

22. Un anticuerpo que se une a un receptor de transferrina (TfR), en donde la afinidad del anticuerpo por el receptor de transferrina (TfR) es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μ M.

23. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la afinidad es de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 1 μ M.

24. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el receptor de transferrina (TfR) es un receptor humano.

25. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22, el cual está acoplado con un fármaco para trastornos neurológicos.

26. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 25, el cual es un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que une el receptor de transferrina (TfR) y un segundo sitio de unión al antígeno que une un antígeno cerebral.

27. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el antígeno cerebral es seleccionado del grupo que consiste en beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), quinasa de repeticiones ricas en leucina 2 (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma secretasa, receptor de muerte 6 (DR6), proteína precursora del amiloide (APP), receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), y caspasa 6.

28. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el antígeno cerebral es BACE1.

29. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el antígeno

cerebral es Abeta.

30. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22, el cual es un fragmento de anticuerpo con una región de unión al antígeno que une el receptor de transferrina (TfR).

31. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 49 que es un fragmento Fab.

32. El anticuerpo multiespecífico de la reivindicación 45 el cual es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo.

Boosting Brain Uptake of a Therapeutic Antibody by Reducing Its Affinity for a Transcytosis Target

Y. Joy Yu,^{1*} Yin Zhang,^{2*} Margaret Kenrick,³ Kwame Hoyte,⁴ Wilman Luk,⁴ Yanmei Lu,⁴ Jasvinder Atwal,¹ J. Michael Elliott,⁵ Saileta Prabhu,³ Ryan J. Watts,^{1†} Mark S. Dennis^{2†}

Monoclonal antibodies have therapeutic potential for treating diseases of the central nervous system, but their accumulation in the brain is limited by the blood-brain barrier (BBB). Here, we show that reducing the affinity of an antibody for the transferrin receptor (TfR) enhances receptor-mediated transcytosis of the anti-TfR antibody across the BBB into the mouse brain where it reaches therapeutically relevant concentrations. Anti-TfR antibodies that bind with high affinity to TfR remain associated with the BBB, whereas lower-affinity anti-TfR antibody variants are released from the BBB into the brain and show a broad distribution 24 hours after dosing. We designed a bispecific antibody that binds with low affinity to TfR and with high affinity to the enzyme β -secretase (BACE1), which processes amyloid precursor protein into amyloid- β (A β) peptides including those associated with Alzheimer's disease. Compared to monospecific anti-BACE1 antibody, the bispecific antibody accumulated in the mouse brain and led to a greater reduction in brain A β after a single systemic dose. TfR-facilitated transcytosis of this bispecific antibody across the BBB may enhance its potency as an anti-BACE1 therapy for treating Alzheimer's disease.

INTRODUCTION

A promising approach to facilitate delivery of protein therapeutics across the blood-brain barrier (BBB) is to take advantage of receptor-mediated transcytosis, an endogenous endocytic process in which a ligand is transported across an endothelial cell barrier (1–4). Although antibodies directed against brain endothelial receptors have been reported, the extent of antibody uptake into the brain under therapeutic dosing conditions remains largely unexplored. Antibodies targeting the transferrin receptor (TfR), which is highly expressed by endothelial cells that make up the BBB, have been reported to cross the BBB (3, 5–7), but whether endocytosis of anti-TfR antibodies into brain vasculature can lead to antibody release and accumulation in brain parenchyma remains controversial (5, 8–10). These previous studies have typically used radiolabeled high-affinity antibodies for TfR administered in trace amounts. Although high affinity ensures binding to TfR and uptake into brain endothelium despite low concentrations in blood, it also likely reduces the probability of antibody being released from the central nervous system (CNS) vasculature, and thus potentially prevents accumulation of antibody in the brain parenchyma.

How can uptake of therapeutic antibodies by receptor-mediated transcytosis be improved? We propose that one possible solution is to use low-affinity antibodies to TfR to increase release of antibody from brain vascular endothelium and enhance uptake and distribution in the brain. In a therapeutic setting, high peripheral concentrations of the antibody would compensate for the low affinity and ensure binding to TfR on the vascular luminal surface, thus ensuring effective

uptake from the periphery. Here, we provide evidence in support of this idea and demonstrate the feasibility of the approach using a bispecific therapeutic antibody with a low affinity for TfR and a high affinity for the enzyme β -secretase (BACE1), an Alzheimer's disease drug target.

RESULTS

A high-affinity anti-TfR antibody that binds to brain vasculature has modest uptake

We first explored the potential of a high-affinity anti-TfR antibody to be taken up into mouse brain in both trace amounts and at therapeutic doses. We generated a human chimeric anti-murine TfR (muTfR) antibody (anti-TfR^A) that does not compete with endogenous binding of transferrin to TfR and then compared its uptake in the mouse brain with a human control immunoglobulin G (IgG) through a double-labeled experiment. A single trace dose of [¹³¹I]anti-TfR^A and [¹²⁵I]control IgG was injected into wild-type mice intravenously, and brain uptake was measured at various time points. A significant increase in [¹³¹I]anti-TfR^A uptake in the brain, measured as a percentage of injected dose per gram of brain, was observed at all time points (Fig. 1A, $P = 0.0056$). At its peak 1 hour after injection, there was a >11-fold difference in [¹³¹I]anti-TfR^A brain accumulation compared to [¹²⁵I]control IgG ($n = 6$; $P < 0.0001$). When unlabeled anti-TfR^A (4 mg/kg of body weight) was coadministered, brain accumulation of [¹³¹I]anti-TfR^A was reduced almost to the level of control IgG, indicating specific target-driven uptake. We next used more therapeutic relevant doses of either anti-TfR^A or control IgG [20 mg/kg, intravenously (iv)], and determined human antibody concentrations in mouse cerebral cortex and serum at 1 and 24 hours. In these experiments, animals were thoroughly perfused with phosphate-buffered saline (PBS) to flush out the vasculature of any remaining antibody before harvesting brains to measure drug concentrations. Compared to control IgG, the concentration of anti-TfR^A was significantly higher in the brain 24 hours after antibody administration (Fig. 1B, $P = 0.0002$,

¹Neurodegeneration Labs, Department of Neuroscience, Genentech Inc., South San Francisco, CA 94080, USA. ²Department of Antibody Engineering, Genentech Inc., South San Francisco, CA 94080, USA. ³Department of Developmental Sciences, Genentech Inc., South San Francisco, CA 94080, USA. ⁴Department of Assay Automation Technology, Genentech Inc., South San Francisco, CA 94080, USA. ⁵Department of Protein Chemistry, Genentech Inc., South San Francisco, CA 94080, USA.

*These authors contributed equally to this work.
†To whom correspondence should be addressed. E-mail: rwatts@gene.com (R.J.W.); msd@gene.com (M.S.D.)

RESEARCH ARTICLE

$n = 10$). Furthermore, the brain-to-serum ratio for anti-TfR^A at 24 hours demonstrates improved brain uptake compared to control IgG (Fig. 1C, $P = 0.003$, $n = 10$).

These results show that systemically administered high-affinity anti-TfR^A can accumulate in the brain when administered at both low and high doses, but does not address whether the antibody is released into the parenchyma. To determine antibody distribution after systemic delivery of anti-TfR^A or control IgG (20 mg/kg), we sectioned and stained PBS-perfused brains with fluorescent anti-human secondary IgG. After 1 hour, anti-TfR^A had a pronounced vascular distribution, as indicated by its colocalization with the basement membrane marker anti-collagen IV (Fig. 1D, left column). Although less pronounced, control IgG also localized to the vasculature (Fig. 1E, left column). At 24 hours, anti-TfR^A exhibited modest parenchymal staining but remained largely vascular (Fig. 1D, right column), whereas

control IgG was absent in the brain tissue (Fig. 1E, right column). Thus, our results confirm and extend previous studies using trace amounts of high-affinity antibody (9, 10) by showing that high-affinity anti-TfR^A was predominantly confined to endothelial cells of the BBB and largely excluded from brain parenchyma when used in either trace amounts or at therapeutic doses.

Lower-affinity anti-TfR antibodies show increased brain uptake

We next explored whether reducing the affinity of the anti-TfR antibody for TfR would enable greater accumulation of the antibody in the brain parenchyma. Alanine mutations were introduced into the complementarity-determining regions of anti-TfR^A to generate variants (anti-TfR^B, anti-TfR^C, and anti-TfR^D) with a range of binding affinities for TfR [Fig. 2A; IC₅₀ (median inhibitory concentration) values

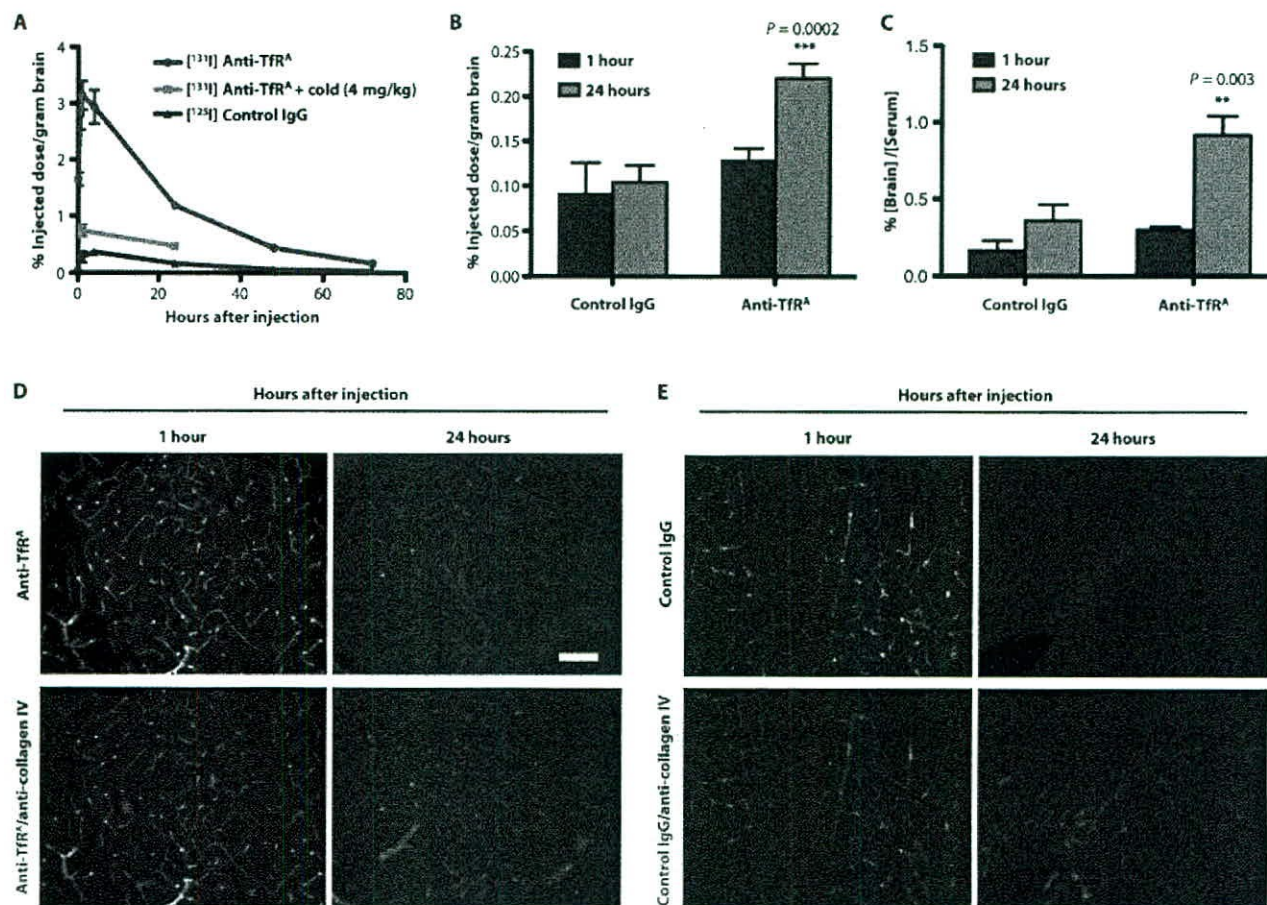


Fig. 1. Systemically administered anti-TfR^A antibody localizes to the brain vasculature. (A) Brain uptake after intravenous administration of trace doses of [¹²⁵I]anti-TfR^A and [¹²⁵I]control IgG in mice was quantified as a mean percentage of injected dose per gram of brain tissue at 5 and 30 min, and then at 1, 4, 24, 48, and 72 hours after intravenous injection ($n = 6$ per group and time point). The enhanced uptake of [¹²⁵I]anti-TfR^A was reduced by co-injection with unlabeled anti-TfR^A (4 mg/kg). (B) Mean antibody uptake in the brain 1 and 24 hours after an intravenous injection of anti-TfR^A (20 mg/kg) showed increased uptake of anti-TfR^A compared to

control IgG ($***P = 0.0002$, $n = 10$ per group and time point). (C) Ratio of mean percent brain to serum concentrations of antibody ($**P = 0.003$, $n = 10$ per group and time point). (D and E) Immunohistochemical staining of brain sections after intravenous injection with anti-TfR^A reveals colocalization of antibody (green) with collagen IV (red). Intravenous injection with control IgG exhibited vascular distribution in the brain at 1 hour but an absence of antibody staining after 24 hours. Images were taken from the mouse cortex for these and all subsequent images. Scale bar, 50 μ m. Magnification, $\times 40$.

RESEARCH ARTICLE

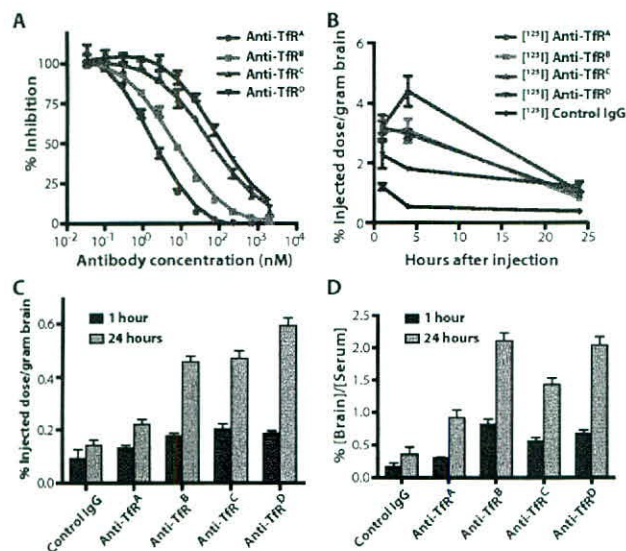


Fig. 2. Lower-affinity anti-TfR antibodies at therapeutic doses show increased brain uptake. (A) Anti-TfR variant antibodies show distinct affinities for TfR by a competitive ELISA assay. IC_{50} values are 1.7 ± 0.1 , 6.9 ± 0.4 , 65 ± 12 , and 111 ± 16 nM for anti-TfR^A, anti-TfR^B, anti-TfR^C, and anti-TfR^D, respectively. (B) Mean brain uptake after intravenous injection of trace doses of [¹²⁵I]anti-TfR variants after 5 min and 1, 4, and 24 hours ($n = 3$ per group and time point) shows reduced brain uptake of lower-affinity anti-TfR variants. (C) Mean brain uptake after an intravenous injection of anti-TfR variants (20 mg/kg) at 1 and 24 hours ($n = 10$ per group and time point) shows increased brain uptake ($P < 0.0001$ at 24 hours). (D) Ratio of mean percent brain to serum concentrations of antibody ($n = 10$) at 1 hour (control IgG = 0.17, anti-TfR^A = 0.30, anti-TfR^B = 0.81, anti-TfR^C = 0.55, anti-TfR^D = 0.68) and at 24 hours (control IgG = 0.36, anti-TfR^A = 0.91, anti-TfR^B = 2.11, anti-TfR^C = 1.43, anti-TfR^D = 2.04).

are 1.7 ± 0.1 , 6.9 ± 0.4 , 65 ± 12 , and 111 ± 16 nM for anti-TfR^A, anti-TfR^B, anti-TfR^C, and anti-TfR^D, respectively]. These were evaluated in both a nonsaturating (trace dosing) and a saturating (therapeutic dosing) TfR paradigm. Trace amounts of [¹²⁵I]-labeled versions of the four antibodies were administered to mice intravenously, and brain uptake was measured. Anti-TfR antibodies delivered at trace doses showed a direct correlation between affinity and brain uptake, with lower-affinity antibodies showing the lowest uptake (Fig. 2B). In marked contrast to trace dosing, however, brain uptake of these same variants at therapeutic doses (20 mg/kg assessed at 1 and 24 hours) showed an inverse correlation between affinity and brain uptake at 24 hours (Fig. 2C; $n = 10$, $P < 0.0001$) and an increase in the brain-to-serum ratio of antibody (Fig. 2D; $P = 0.0032$). Furthermore, the lowest-affinity variant anti-TfR^D showed a greater than fivefold increase in brain antibody concentration compared to control IgG 24 hours after injection (fig. S1).

On the basis of these results and our initial hypothesis, we propose the following model (Fig. 3). Compared to a high-affinity antibody that binds tightly to brain endothelial receptors, a low-affinity antibody is less likely to bind and remain bound to luminal TfR receptors in the vasculature when serum concentrations of antibody are low (that is, trace dosing). Thus, under nonsaturating concentrations, receptor-mediated transcytosis of the low-affinity antibody is reduced and brain uptake is low (Fig. 3, left panels). At a higher dose (that is, therapeutic dosing), luminal TfR would be saturated regardless of antibody

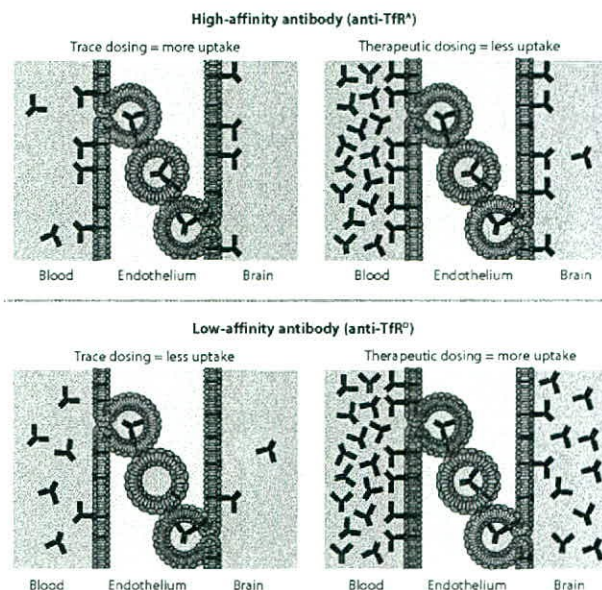


Fig. 3. Model illustrating the inverse relationship between the antibody's affinity for TfR and its uptake in brain. (Top, left panel) With trace dosing, a higher-affinity anti-TfR antibody will bind more receptors expressed on the luminal (blood) side of the endothelial cells that make up the BBB compared with trace dosing of lower-affinity antibodies (bottom, left panel), resulting in more high-affinity antibodies associated with brain endothelium. At therapeutic doses, saturating concentrations of antibody will result in antibody binding to receptors on the luminal side of the BBB epithelium regardless of antibody affinity (top and bottom right panels). The dissociation of antibody after receptor-mediated transcytosis will be more likely with a lower-affinity antibody, resulting in accumulation of lower-affinity antibody in the brain parenchyma (bottom right panel). Furthermore, the probability of efflux out of the brain parenchyma will be lower for a low-affinity TfR antibody because concentrations in the brain are likely to be no longer saturating (similar to left panels, but in the brain to blood direction).

affinity, resulting in similar endothelial uptake for both high- and low-affinity antibodies (Fig. 3, right panels); however, a low-affinity antibody could lead to greater total brain accumulation through an increased dissociation from TfR and release into the brain. Moreover, a lower-affinity antibody decreases the probability of receptor-mediated efflux out of the parenchyma because concentrations in the brain are likely to be no longer saturating.

Broad distribution of low-affinity anti-TfR antibody in mouse brain parenchyma

Although increased brain accumulation under therapeutic dosing conditions fit with our model (Fig. 3), we also wanted to examine parenchymal distribution of antibody at therapeutic doses. To address this, we compared antibody distribution in brain tissue for each affinity variant (Fig. 4, A to D). Mice were dosed at 20 mg/kg and PBS-perfused after 24 hours. Brain sections were stained with fluorescent anti-human secondary IgG to visualize antibody distribution. As described above, the high-affinity anti-TfR^A antibody localized predominantly to the vasculature (Fig. 4A). In contrast, lower-affinity variants localized with the neuronal marker NeuN, suggesting their broad distribution in the

brain parenchyma surrounding neurons (Fig. 4, B to D). In particular, anti-TfR^D exhibited noticeable and pronounced parenchymal staining (Fig. 4D). A representative high-magnification image further illustrates

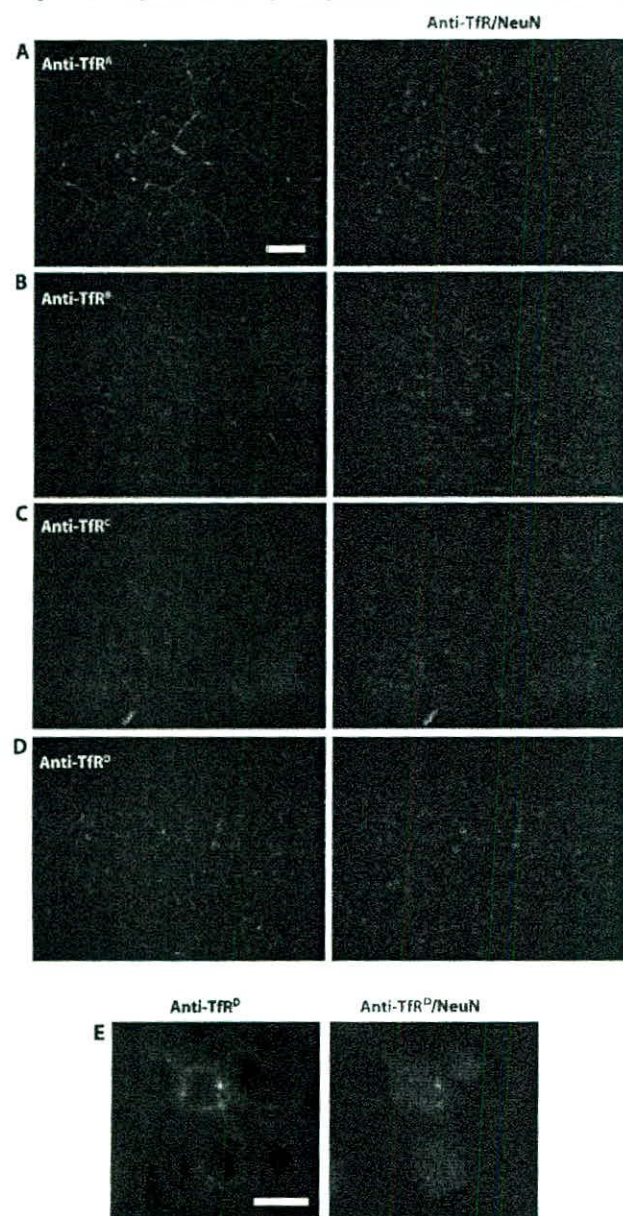


Fig. 4. Brain distribution of low-affinity anti-TfR antibody. (A to D) Comparison of immunohistochemical staining of brain sections 24 hours after intravenous injection of mice with one of four anti-TfR variants (anti-TfR^A, anti-TfR^B, anti-TfR^C, or anti-TfR^D) (20 mg/kg). Staining reveals differences in antibody distribution depending on whether the antibodies have high or low affinity for TfR. (B to D) Lower-affinity antibodies (green) show localization around NeuN-positive neuronal cell bodies (red) in the mouse brain, whereas the high-affinity anti-TfR^A antibody (A) remains largely associated with the vasculature. Scale bar, 50 μ m. (E) Representative high-magnification image showing localization of low-affinity anti-TfR^D antibody (green) around neurons (NeuN, red). Scale bar, 20 μ m.

neuronal localization of the anti-TfR^D variant (Fig. 4E). This parenchymal distribution was especially pronounced when analyzing three-dimensional (3D) reconstructed confocal images that were converted into rotating movies comparing control IgG, anti-TfR^A, and anti-TfR^D (movies S1, S2, and S3, respectively). Together, these results indicate that lowering the antibody affinity for TfR can markedly enhance accumulation of antibody in brain parenchyma.

Generation and characterization of an anti-TfR/BACE1 bispecific antibody

To further confirm transport of anti-TfR antibodies across the BBB and to test whether antibody can accumulate in physiologically relevant amounts, we generated a bispecific antibody (anti-TfR/BACE1) that binds to both TfR and BACE1 (Fig. 5A). BACE1 is expressed in the CNS and is considered to be the primary contributor of amyloid- β ($A\beta$) peptide formation through its ability to cleave amyloid precursor protein (APP) in the brain (11, 12). An antibody to BACE1 effectively inhibits BACE1 activity in vivo, resulting in reduced $A\beta_{1-40}$ production in the periphery as well as in the brain, albeit at very high peripheral doses [see Atwal *et al.* (13), this issue]. When choosing an anti-TfR antibody from which to generate the anti-TfR arm of the bispecific anti-TfR/BACE1, we noted that there was considerable loss of affinity for TfR compared to the starting monospecific TfR antibodies because of loss of avidity and bivalent binding. Thus, when we generated the bispecific antibody using the higher-affinity anti-TfR^A, the resulting bispecific antibody had an affinity for TfR that was comparable to native anti-TfR^C and anti-TfR^D (Fig. 5B; anti-TfR^A: IC₅₀ = 1.7 $\pm$ 0.1 nM; anti-TfR/BACE1: IC₅₀ = 45 $\pm$ 3 nM). The anti-TfR/BACE1 bispecific antibody inhibited $A\beta_{1-40}$ production in a stably transfected human embryonic kidney (HEK) 293 cell line expressing human APP with slightly reduced potency compared to monospecific anti-BACE1, indicating that bivalent binding is not required to inhibit BACE1 activity in cells (Fig. 5C).

Bispecific anti-TfR/BACE1 uptake and distribution in brain

When administered at trace doses, higher brain accumulation was observed with the [¹²⁵I]anti-TfR/BACE1 bispecific antibody compared to [¹²⁵I]anti-BACE1 antibody up to 48 hours after injection (Fig. 5D, *n* = 4, *P* = 0.05). Consistent with our model, brain uptake of [¹²⁵I]anti-TfR^A was much greater than that of the lower TfR affinity [¹²⁵I]anti-TfR/BACE1 in these trace dosing experiments. At therapeutic doses, however, the anti-TfR/BACE1 bispecific antibody exhibited much higher brain uptake compared to either anti-BACE1 or anti-TfR^A (Fig. 5E and fig. S2, also compare to Fig. 1B), again consistent with our model. Peak brain accumulation at 24 hours achieved concentrations of ~20 nM and remained elevated at 48 hours after injection (fig. S2A). Enhanced uptake of the bispecific antibody is especially apparent when comparing the average percent of antibody in the brain versus in the serum (Fig. 5F). Similar to low-affinity anti-TfR antibody localization, anti-TfR/BACE1 showed broad distribution throughout the brain parenchyma in addition to vascular staining (Fig. 5G and fig. S2B). The localization of anti-TfR/BACE1 to brain parenchyma was especially evident when analyzing 3D reconstructed confocal images [movie S4, also compare control IgG (movie S1) and anti-TfR^A (movie S2)]. In contrast, mice injected with anti-BACE1 antibody showed very little brain vascular or parenchymal staining at 24 hours, similar to control IgG (compare Fig. 5G and fig. S2B with Fig. 1E).

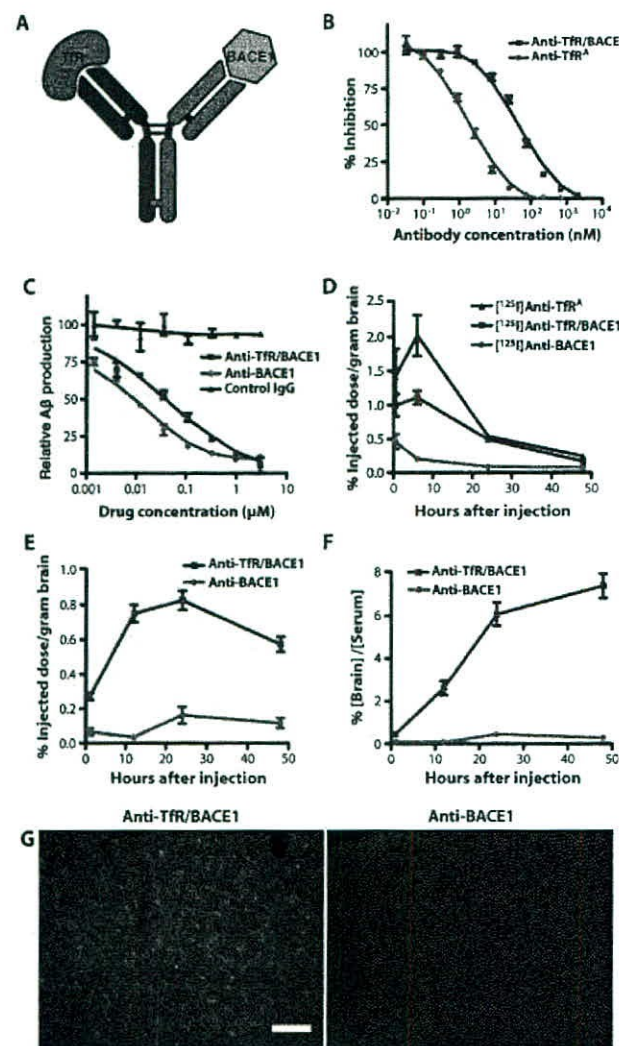


Fig. 5. An anti-TfR/BACE1 bispecific antibody blocks A β production in vitro and accumulates in the brain in vivo. (A) Model of the bispecific antibody, which was engineered to bind to both TfR and the enzyme β -secretase (BACE1). (B) Affinities of the parental anti-TfR^A ($IC_{50} = 1.7 \pm 0.1$ nM) and anti-TfR/BACE1 ($IC_{50} = 45 \pm 3$ nM) as measured by a competitive ELISA assay showed a significantly reduced affinity of the bispecific antibody for TfR. (C) Quantification of human A β_{1-40} in HEK293-hAPP^{WT} cells after titration with anti-TfR/BACE1, anti-BACE1, and control IgG in a cell-based assay reveals slightly reduced potency of anti-TfR/BACE1 compared with anti-BACE1. (D) Mean brain uptake after trace doses of ¹²⁵I-labeled antibody for 30 min and 6, 24, and 48 hours after intravenous injection in mice ($n = 4$ per group and time point) shows reduced uptake of anti-TfR/BACE1 compared with anti-TfR. (E and F) Mean antibody uptake (at 48 hours: anti-BACE1 = $0.12 \pm 0.03\%$; anti-TfR/BACE1 = $0.57 \pm 0.04\%$) (E) and average brain-to-serum ratio at 1, 12, 24, and 48 hours after an intravenous injection of an antibody (20 mg/kg) in mice ($n = 10$ per group and time point) (F), showing a robust uptake of anti-TfR/BACE1 with therapeutic dosing (at 48 hours: anti-BACE1 = $0.28 \pm 0.08\%$; anti-TfR/BACE1 = $7.40 \pm 0.58\%$). (G) Immunohistochemical staining of brain sections from mice 24 hours after an intravenous injection with either anti-TfR/BACE1 or anti-BACE1 (20 mg/kg). Images show broad staining in the brain parenchyma for the anti-TfR/BACE1 bispecific antibody compared with minimal staining for the monospecific anti-BACE1 antibody (see also fig. S2B).

Anti-TfR/BACE1 bispecific antibody reduces brain A β

On the basis of the impressive brain uptake and localization of the anti-TfR/BACE1 bispecific antibody after a single injection, we next examined whether BACE1 inhibition in vivo could be boosted using the bispecific antibody compared to the monospecific anti-BACE1 antibody, as assessed by a reduction in brain A β . Indeed, at 25 mg/kg, anti-TfR/BACE1 was able to significantly reduce brain A β_{1-40} concentrations compared to control IgG 24 hours after injection (control IgG, 1598.7 pg/g; anti-TfR/BACE1, 1031.5 pg/g; $P = 0.001$, $n = 10$) and 48 hours after injection (control IgG, 1791.3 pg/g; anti-TfR/BACE1, 1453.2 pg/g; $P = 0.0003$, $n = 10$). In contrast, the anti-BACE1 monospecific antibody had no effect on brain A β_{1-40} over this time period (Fig. 6A). At 50 mg/kg, anti-TfR/BACE1 had an even more marked effect in reducing brain A β_{1-40} at both time points compared to control IgG (Fig. 6B; at 24 hours: control IgG, 1903.0 pg/g; anti-TfR/BACE1, 1005.7 pg/g; at 48 hours: control IgG, 1733.7 pg/g; anti-TfR/BACE1, 867.5 pg/g; $P < 0.0001$, $n = 10$). Administration of anti-BACE1 at this dose also significantly reduced brain A β_{1-40} concentrations compared

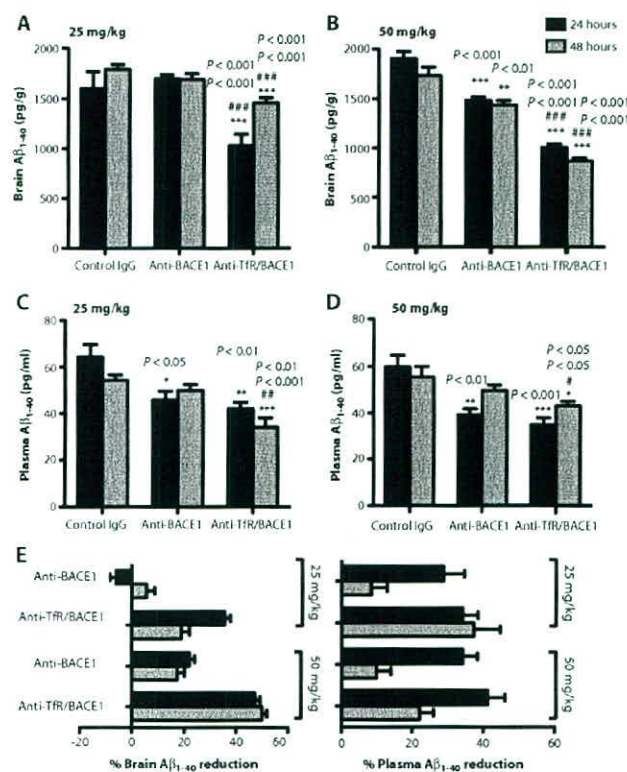


Fig. 6. Systemic dosing with anti-TfR/BACE1 reduces brain A β . (A to D) Quantification of A β_{1-40} concentrations in mouse brain (A and B) and plasma (C and D) after an intravenous injection of control IgG, anti-BACE1, or anti-TfR/BACE1 (25 or 50 mg/kg). Asterisks (*) represent significance compared to control IgG, whereas pound signs (#) represent significance compared to anti-BACE1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 10$ per group and time point. (E) Mean A β_{1-40} reduction from data in (A) to (D) calculated as a percentage of A β_{1-40} concentrations relative to those in mice injected with control IgG. Anti-TfR/BACE1 reduces brain A β concentrations at both doses and time points when compared to either control IgG or anti-BACE1 antibody.

RESEARCH ARTICLE

to control (Fig. 6B; 1480.9 pg/g at 24 hours and 1433.1 pg/g at 48 hours; $P < 0.0001$, $n = 10$ at 24 hours; $P = 0.006$, $n = 10$ at 48 hours), although to a lesser extent than did the bispecific anti-TfR/BACE1. The maximal effect of anti-TfR/BACE1 was achieved 48 hours after injection at 50 mg/kg, with a $50.0 \pm 1.9\%$ reduction in brain $A\beta_{1-40}$ compared to control IgG (Fig. 6E). These reductions after a single dose are impressive when considering that mice lacking BACE1 show a maximal $A\beta_{1-40}$ reduction of ~80% (13). A significant decrease in peripheral $A\beta_{1-40}$ was also observed at both doses and time points for anti-TfR/BACE1, and at the 24-hour time point for anti-BACE1 (Fig. 6, C and D).

We next determined how brain concentrations of anti-TfR/BACE1 and anti-BACE1 relate to $A\beta$ reduction. As expected, the reductions in $A\beta_{1-40}$ concentrations in the brain correlated with much higher brain concentrations of anti-TfR/BACE1 compared to anti-BACE1 and control IgG (fig. S3). Neither anti-TfR^A (the original arm used to generate the anti-TfR/BACE1 bispecific antibody) nor anti-TfR^C (with a binding affinity for TfR similar to that of anti-TfR/BACE1) reduced $A\beta_{1-40}$ appreciably (fig. S4), indicating that the anti-TfR arm of the anti-TfR/BACE1 bispecific antibody did not contribute to the marked reduction in $A\beta_{1-40}$ after a single dose. Together, these results indicate that increasing the concentration of a BACE1-targeting antibody in the brain by exploiting TfR-mediated transcytosis can significantly enhance the potency of this potential therapeutic antibody.

DISCUSSION

Our results reveal an unexpected relationship between antibody affinity for TfR, a target of receptor-mediated transcytosis, and the extent of brain uptake of the antibody and its distribution in the brain parenchyma. The reduction in $A\beta$ production by the anti-TfR/BACE1 bispecific antibody also demonstrates that the TfR pathway of receptor-mediated transcytosis is sufficiently robust to deliver a concentration of antibody across the BBB that is therapeutically relevant, at least in mice. This insight is particularly relevant in a clinical setting where the serum antibody concentration that is administered can typically be high, and where we predict that enhanced CNS delivery using TfR or another receptor-mediated transcytosis pathway can be achieved by reducing the affinity of the antibody for the receptor. To test this approach in primates, an anti-TfR antibody that binds to monkey and human TfR must be generated. Furthermore, although the anti-TfR antibody used in this study does not block binding of transferrin to TfR, the acute and chronic safety considerations of using antibodies raised against TfR to increase uptake in brain have not been explored. For example, investigation of iron transport and uptake (mediated by TfR) will be essential for determining the clinical feasibility of this approach. In addition, the broader consequences of increased exposure of brain tissue to antibody will require further investigation.

Although the TfR pathway appears to be a particularly robust route for CNS uptake of large molecules, it should be expected that, at some point, brain uptake will be limited by the receptor concentration and the rate of transcytosis. These limitations may vary for different receptor-mediated transcytosis targets, and so, the full potential of this approach requires investigation of these other targets. Furthermore, other receptor-mediated transcytosis targets may provide the added benefit of BBB-specific expression, in contrast to the broadly expressed TfR. Nevertheless, our findings demonstrate substantial promise for brain-penetrating bispecific therapeutic antibodies that exploit receptor-mediated transcytosis,

and provide evidence that this approach may be useful in targeting a wide range of CNS diseases with antibody therapy.

MATERIALS AND METHODS

Cloning and purification of muTfR

Amino acids 122 to 640 corresponding to the extracellular domain of muTfR were polymerase chain reaction (PCR)-amplified and inserted into the pRK5.sm protein expression vector (Genentech) with the herpes simplex virus glycoprotein D signal sequence and an N-terminal 8× His tag. muTfR was expressed in HEK293 cells. Expression media containing muTfR were conditioned with 1 mM sodium azide, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.3 M NaCl, and 15 mM imidazole and adjusted to pH 7.0. Precharged nickel resin (Ni-NTA superflow, Qiagen) was added to media for batch absorption at 4°C overnight and then packed into a column and washed with PBS and 0.3 M NaCl (pH 7.4), followed by 25 mM imidazole, 0.3 M NaCl, and 1 mM sodium azide (pH 8.0). The column was eluted with 250 mM imidazole, 0.3 M NaCl, and 1 mM sodium azide (pH 8.0). The eluent was concentrated [10,000 molecular weight cutoff (MWCO) Amicon Ultra, Millipore] and dialyzed (10,000 MWCO dialysis cassette, Pierce) into PBS and 0.3 M NaCl and further purified by size exclusion chromatography (Superdex 200, GE Healthcare) to remove aggregate and contaminants. The final pool was sterile-filtered and characterized by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, optical density at 280 nm, endotoxin assay, laser light scattering, and mass spectrometry.

Generation of anti-TfR and anti-TfR variant antibodies

Variants of anti-TfR^A were generated by substituting alanine at key positions in the complementarity-determining regions. Affinities were determined with the xTfR competition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that measured the inhibition of biotinylated anti-TfR^A binding to immobilized muTfR. Variants anti-TfR^B, anti-TfR^C, and anti-TfR^D were selected as representative variants that covered a wide affinity range. All IgGs were expressed with human constant domains in Chinese hamster ovary cells and purified by conventional means. The anti-TfR/BACE1 bispecific antibody was generated using knobs into holes technology (14). Each heavy chain (anti-TfR^A and anti-BACE1) was expressed with its corresponding light chain in separate *Escherichia coli* cultures. Individual half-antibodies were purified and combined, and the bispecific antibody was purified by conventional means.

Radiolabel studies

A modified Chizzonite radioiodination protocol was used to label antibodies with ¹²⁵I or ¹³¹I (2, 15). Male CB-17 wild-type mice were randomized into two groups. All groups received control ([¹²⁵I]control antibody, 5 mCi iv) plus either tracer ([¹³¹I]anti-TfR, 5 mCi iv) or tracer + cold ([¹³¹I]anti-TfR^A, 5 mCi + 4 mg/kg iv). After injection, blood and brain tissues were collected at designated time points. Collected samples were analyzed for total radioactivity per gram of tissue. Brain tissue radioactivity was corrected for contribution of blood concentration to counts ($n = 6$ per group).

Antibody affinity measurements

The anti-TfR competition ELISA was performed in MaxiSorp plates (Nunc) coated with purified muTfR-His (2.5 µg/ml) in PBS at 4°C overnight. Plates were washed with PBS and 0.05% Tween 20 and blocked

RESEARCH ARTICLE

with Superblock blocking buffer in PBS (Thermo Scientific). A titration of anti-TfR^A, anti-TfR^B, anti-TfR^C, or anti-TfR^D (0.2 to 4000 nM, 1:3 serial dilution) was combined with 1 nM biotinylated anti-TfR^A and added to the plate for 1 hour at room temperature. Plates were washed with PBS and 0.05% Tween 20, and horseradish peroxidase (HRP)–streptavidin (SouthernBiotech) was added to the plate and incubated for 1 hour at room temperature. Plates were washed with PBS and 0.05% Tween 20, and biotinylated anti-TfR^A bound to the plate was detected with 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB) substrate (BioFX Laboratories).

Immunohistochemistry

To determine antibody distribution in the brain, we intravenously injected wild-type mice with an indicated antibody (20 mg/kg). After the indicated time, mice were perfused with Dulbecco's PBS (D-PBS) (Invitrogen) at a rate of 2 ml/min for 8 min, and brains were fixed in 4% paraformaldehyde for ~18 hours, followed by 30% sucrose for 24 hours. Floating microtome sagittal sections of hemibrains were blocked in 5% bovine serum albumin (BSA) and 0.3% Triton X-100 before staining with primary antibodies overnight in 1% BSA and 0.1% Triton X-100 (rabbit anti-collagen IV, Cosmo Bio Co.; anti-mouse NeuN, Millipore). Anti-TfR and anti-TfR/BACE1 were visualized with Alexa488 anti-human secondary antibody, whereas collagen IV and NeuN were visualized with Alexa594 anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies, respectively (Molecular Probes, Invitrogen). Epifluorescent images of cortical regions (all images) were obtained with the Zeiss AxioCam 20x/0.50-mm and 40x/0.75-mm aperture objectives and the AxioVision software. Confocal z-stack images of cortical regions were obtained with the Zeiss LSM-710, and 3D reconstructions were generated with Imaris.

Measuring antibody concentrations in mouse brain and serum

The animals' care was in accordance with institutional guidelines. Wild-type female C57B/6 mice ages 6 to 8 weeks were used for all studies. Mice were intravenously injected with anti-TfR variants, control IgG, or anti-TfR/BACE1 (20 mg/kg). Total injection volume did not exceed 250 μ l, and antibodies were diluted in D-PBS when necessary (Invitrogen). After the indicated time, mice were perfused with D-PBS at a rate of 2 ml/min for 8 min. Brains were extracted, and the cortex and hippocampus were isolated and homogenized in 1% NP-40 (Calbiochem) in PBS containing Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics). Homogenized brain samples were rotated at 4°C for 1 hour before spinning at 14,000 rpm for 20 min. Supernatant was isolated for brain antibody measurement. Whole blood was collected before perfusion in serum separator microcontainer tubes (BD Diagnostics), allowed to clot for at least 30 min, and spun down at 5000g for 90 s. Supernatant was isolated for antibody measurement in serum.

Antibody concentrations in mouse serum and brain samples were measured with an ELISA. Nunc 384-well Maxisorp immunoplates were coated with F(ab')₂ fragment of donkey anti-human IgG, Fc fragment-specific polyclonal antibody (Jackson ImmunoResearch) overnight at 4°C. Plates were blocked with PBS and 0.5% BSA for 1 hour at 25°C. Each antibody (control IgG, anti-TfR variants, anti-BACE1, and anti-TfR/BACE1 bispecific) was used as an internal standard to quantify respective antibody concentrations. Plates were washed with PBS and 0.05% Tween 20 with a microplate washer (Bio-Tek Instruments Inc.), and standards and samples diluted in PBS containing 0.5% BSA, 0.35 M NaCl, 0.25% CHAPS, 5 mM EDTA, 0.05% Tween 20, and 15 parts per million (ppm) Proclin were added for 2 hours at 25°C. Bound

antibody was detected with HRP-conjugated F(ab')₂ goat anti-human IgG, Fc-specific polyclonal antibody (Jackson ImmunoResearch) and developed with TMB (KPL Inc.), and absorbance was measured at 450 nm on a Multiskan Ascent reader (Thermo Scientific). Concentrations were determined from the standard curve with a four-parameter nonlinear regression program. The assay had a lower limit of quantification values of 3.12 ng/ml in serum and 15.6 ng/g in the brain. Statistical analysis of differences between experimental groups was performed with two-tailed unpaired *t* test.

Cellular A β ₁₋₄₀ assays

Inhibition of A β ₁₋₄₀ production in HEK293 cells stably expressing wild-type human APP was assessed with HEK293-APP^{WT} cells and seeded overnight at a density of 3×10^4 cells per well in a 96-well plate. Fresh media [50 μ l of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 10% fetal bovine serum (FBS)] containing an anti-BACE1 antibody or a control IgG1 antibody were added for 24 hours at 37°C and then assayed for the presence of A β ₁₋₄₀ with a A β ₁₋₄₀ homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay (CisBio) according to the manufacturer's instructions. A β ₁₋₄₀ values were normalized for cell viability, as determined with the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Experiments were performed at least three times, and each point in each experiment was repeated in duplicate.

Measuring mouse A β ₁₋₄₀ in mouse brain and plasma

Mice were intravenously injected with the indicated antibody (25 or 50 mg/kg) for either 24 or 48 hours. Antibody treatment and perfusions were performed in WT mice as stated above. For A β ₁₋₄₀ measurements, hemibrains were homogenized in 5 M guanidine hydrochloride buffer and samples were rotated for 3 hours at room temperature before diluting (1:10) in 0.25% casein and 5 mM EDTA (pH 8.0) in PBS containing freshly added aprotinin (20 mg/ml) and leupeptin (10 mg/ml). Diluted homogenates were spun at 14000 rpm for 20 min, and supernatants were isolated for A β ₁₋₄₀ measurement. For antibody concentration measurements, the corresponding hemibrain from each mouse was homogenized in 1% NP-40 as stated above. Whole blood was collected in EDTA microcontainer tubes (BD Diagnostics) before perfusion and spun at 5000g for 15 min, and supernatant was isolated for measuring plasma mouse A β ₁₋₄₀ and anti-TfR/BACE1 concentrations. The concentrations of total mouse A β ₁₋₄₀ in plasma and brain were determined with a sandwich ELISA following similar procedures described above. Rabbit polyclonal antibody specific for the C terminus of A β ₁₋₄₀ (Millipore) was coated onto plates, and biotinylated anti-mouse A β monoclonal antibody M3.2 (Covance) was used for detection. The assay had lower limit of quantification values of 1.96 pg/ml in plasma and 39.1 pg/g in the brain. Statistical analysis of differences between experimental groups was performed with two-tailed unpaired *t* test.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/3/84/84ra44/DC1

Fig. S1. Lower-affinity anti-TfR antibodies show increased concentrations in the brain after intravenous injection.

Fig. S2. Enhanced brain uptake and parenchymal distribution of the anti-TfR/BACE1 bispecific antibody.

Fig. S3. Increased brain antibody levels of anti-TfR/BACE1 compared to anti-BACE1 in a mouse efficacy study.

Fig. S4. Anti-TfR antibodies do not reduce A β levels in vivo.

Movies S1 to S4. 3D reconstructed confocal z-stack images showing distribution of injected antibody (green) with neuronal cell bodies (NeuN, red).

REFERENCES AND NOTES

1. J. B. Fishman, J. B. Rubin, J. V. Handrahan, J. R. Connor, R. E. Fine, Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. *J. Neurosci. Res.* **18**, 299–304 (1987).
2. R. L. Roberts, R. E. Fine, A. Sandra, Receptor-mediated endocytosis of transferrin at the blood-brain barrier. *J. Cell Sci.* **104**, 521–532 (1993).
3. A. R. Jones, E. V. Shusta, Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm. Res.* **24**, 1759–1771 (2007).
4. K. Kissel, S. Hamm, M. Schulz, A. Vecchi, C. Garlanda, B. Engelhardt, Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood-tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochem. Cell Biol.* **110**, 63–72 (1998).
5. H. J. Lee, B. Engelhardt, J. Lesley, U. Bickel, W. M. Pardridge, Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 1048–1052 (2000).
6. W. M. Pardridge, J. L. Buciak, P. M. Friden, Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259**, 66–70 (1991).
7. W. A. Jefferies, M. R. Brandon, S. V. Hunt, A. F. Williams, K. C. Gatter, D. Y. Mason, Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* **312**, 162–163 (1984).
8. P. M. Friden, L. R. Walus, G. F. Musso, M. A. Taylor, B. Malfroy, R. M. Starzyk, Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 4771–4775 (1991).
9. T. Moos, E. H. Morgan, Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood-brain barrier in the rat. *J. Neurochem.* **79**, 119–129 (2001).
10. S. Gosk, C. Vermehren, G. Storm, T. Moos, Targeting anti-transferrin receptor antibody (OX26) and OX26-conjugated liposomes to brain capillary endothelial cells using in situ perfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24**, 1193–1204 (2004).
11. R. Vassar, B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M. A. Jarosinski, A. L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J. C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, M. Citron, β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735–741 (1999).
12. S. L. Roberds, J. Anderson, G. Basl, M. J. Blenkowski, D. G. Branstetter, K. S. Chen, S. B. Freedman, N. L. Frigon, D. Games, K. Hu, K. Johnson-Wood, K. E. Kappenman, T. T. Kawabe, I. Kola, R. Kuehn, M. Lee, W. Liu, R. Motter, N. F. Nichols, M. Power, D. W. Robertson, D. Schenk, M. Schoor, G. M. Shopp, M. E. Shuck, S. Sinha, K. A. Svensson, G. Tatsuno, H. Tintrup, J. Wijsman, S. Wright, L. McConlogue, BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary β -secretase activity in brain: Implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1317–1324 (2001).
13. J. K. Atwal, Y. Chen, C. Chiu, D. L. Mortensen, W. J. Meilandt, Y. Liu, C. E. Heise, K. Hoyte, W. Luk, Y. Lu, K. Peng, P. Wu, L. Rouge, Y. Zhang, R. A. Lazarus, K. Searce-Levie, W. Wang, Y. Wu, M. Tessier-Lavigne, R. J. Watts, A therapeutic antibody targeting BACE1 inhibits amyloid- β production in vivo. *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011).
14. J. B. Ridgway, L. G. Presta, P. Carter, 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* **9**, 617–621 (1996).
15. R. Chizzonite, T. Trutt, F. J. Podlaski, A. G. Wolitzky, P. M. Quinn, P. Nunes, A. S. Stern, M. K. Gately, IL-12: Monoclonal antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biologic activity on activated human lymphoblasts. *J. Immunol.* **147**, 1548–1556 (1991).
16. **Acknowledgments:** We thank A. Boswell and L. Khawli for design and preparation of radiolabeled antibodies. We thank J. Maloney for cloning; R. Tong, A. Koch, and J. M. Scheer for protein purification; and A. Bruce for the generations of illustrations. We also thank M. Sheng, J. Lewcock, M. Tessier-Lavigne, R. Port, F. Peale, and many others for their insight and collaborative assistance. **Funding:** Genentech Inc. **Author contributions:** R.J.W. and M.S.D. designed the project. Y.J.Y. and Y.Z. contributed to the study design and data collection. M.S.D. and Y.Z. designed and generated the antibodies and performed in vitro binding experiments and competitive ELISA experiments. M.K. and S.P. designed and performed all radiolabeled brain uptake studies. J.A. designed, performed, and analyzed cell-based assays. R.J.W. and Y.J.Y. designed, performed, oversaw, and analyzed in vivo experiments. K.H., W.L., and Y.L. ran pharmacokinetic and pharmacodynamic assays. J.M.E. produced the bispecific antibody. Y.J.Y., R.J.W., and M.S.D. wrote the manuscript, with valuable input from S.P., Y.Z., and M.K. **Data and materials access:** Data and materials are available from Genentech under a materials transfer agreement. **Competing interests:** All authors are paid employees of Genentech Inc. Genentech has filed a patent application related to this work on blood-brain barrier transport using transferrin receptor antibodies.

Submitted 4 February 2011

Accepted 5 May 2011

Published 25 May 2011

10.1126/scitranslmed.3002230

Citation: Y. J. Yu, Y. Zhang, M. Kenrick, K. Hoyte, W. Luk, Y. Lu, J. Atwal, J. M. Elliott, S. Prabhu, R. J. Watts, M. S. Dennis, Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra44 (2011).

124775

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

29



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 002048

Bogotá D.C., Enero 07 de 2015 - 14:27:28

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	610779330	07/01/2015	97.890.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
20 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	640.000.00
			\$640.000.00

SON: **SEISCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-154248-00004-0000

Fecha: 2015-01-13 16:26:13 Dep 2020 DIR.NUEVASCF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 30

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 7 de 2015 - 14:27:52

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

30



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 002033

Bogotá D.C., Enero 07 de 2015 - 14:27:28

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	610779330	07/01/2015	97.890.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
2 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	64.000.00
			\$64.000.00

SON: **SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-154248- -00004-0000

Fecha: 2015-01-13 16:26:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 30