SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-154248- -00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:40:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TITULO** ANTICUERPOS PARA EL RECEPTOR DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA DE BAJA AFINIDAD Y SUS USOS

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** GENENTECH, INC.

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.** _____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-154248- -00000-0000
Fecha: 2013-06-28 16:40:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139

AS. 124.775

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2011/062445	Fecha	29.11.2011
Publicación Internacional No.	WO 2012/075037	Fecha	07.06.2012

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

ANTICUERPOS PARA EL RECEPTOR DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA DE BAJA AFINIDAD Y SUS USOS

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1. GENENTECH, INC.			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	1 DNA Way, 94080	No. TELÉFONO	
CIUDAD	South San Francisco	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO	CA	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	CA
PAÍS DE RESIDENCIA	US		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1. DENNIS	Mark	US
2. WATTS	Ryan Jefferson	US
3. YU	Yunhua Joy	US
4. ZHANG	Yin	CN

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
2. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
3. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
4. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.

9 ☐ **REPRESENTANTE LEGAL** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO	JUAN PABLO	C.C . 80.410.337 T.P . 57492

DIRECCIÓN	Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO	7442200
CIUDAD	Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	
PAÍS	CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. US	US	61/418,223	2010/11/30
2.			
3.			

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.

13	REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	**No.** 13–46830, 13-54534, 13-50408	**Fecha:** 26.06.2013

16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL *Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)*



17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 4-87
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 55
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 95-117
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.
10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar:

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 June 2012 (07.06.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/075037 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/062445

(22) International Filing Date:
29 November 2011 (29.11.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/418,223 30 November 2010 (30.11.2010) US

(71) Applicant *(for all designated States except AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR, US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(71) Applicant *(for AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR only)*: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG** [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **DENNIS, Mark** [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **WATTS, Ryan Jefferson** [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **YU, Yunhua Joy** [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **ZHANG, Yin** [CN/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(74) Agents: **ELLIOTT, Jennifer L.** et al.; 1 DNA Way, Mail Stop 49, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: LOW AFFINITY BLOOD BRAIN BARRIER RECEPTOR ANTIBODIES AND USES THEREFOR

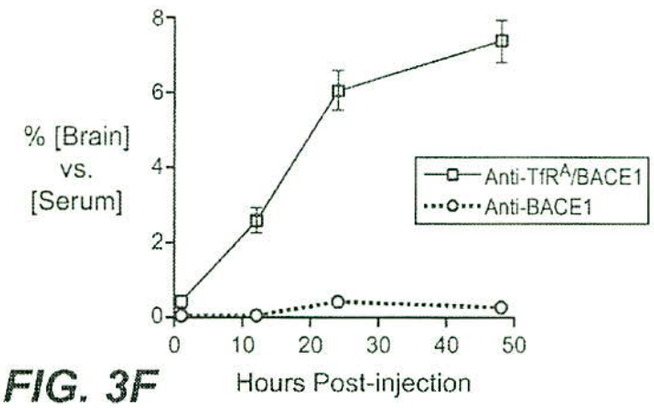


FIG. 3F

(57) Abstract: The present invention relates to antibodies that bind blood brain barrier receptors (BBB-R) and methods of using the same.

WO 2012/075037 A1

ANTICUERPOS PARA EL RECEPTOR DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA DE BAJA AFINIDAD Y SUS USOS

SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos U.S. 61/418,223 presentada el 30 de noviembre de 2010, la cual es incorporada por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a los receptores de la barrera hematoencefálica (BBB–R) y los métodos de usar los mismos.

ANTECEDENTES

La penetración de fármacos de molécula grande está severamente limitada por la barrera hematoencefálica (BBB) en gran parte impermeable. Entre las diversas estrategias para superar este obstáculo está utilizar las vías de tráfico por transcitosis de los receptores endógenos expresados en el endotelio capilar cerebral. Las proteínas recombinantes tales como anticuerpos monoclonales se han diseñado contra esos receptores para permitir la administración mediada por receptor de moléculas grandes al cerebro. Sin embargo, las estrategias para maximizar la captación del cerebro a la vez que minimizar la transcitosis inversa de nuevo a la sangre, y el grado de acumulación después de la dosificación terapéutica, aún continúan sin explorar. Además, se desconoce si los anticuerpos que cruzan la BBB son farmacodinámicamente funcionales.

SÍNTESIS

Los anticuerpos monoclonales tienen un vasto potencial terapéutico para el tratamiento de las enfermedades neurológicas o del sistema nervioso central (SNC), pero su pasaje en el cerebro está restringido por la barrera hematoencefálica (BBB). Estudios anteriores han demostrado que un muy pequeño porcentaje (aproximadamente 0.1%) de un IgG que circula en el torrente sangúineo cruza a través de la BBB en el SNC (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52: 1158-1164 (1974)), donde la concentración del anticuerpo en el SNC puede no ser suficiente para permitir un efecto robusto. Los métodos y composiciones de la invención proporcionan una manera de aumentar el porcentaje del anticuerpo que se distribuye en el SNC y de esta manera lograr más fácilmente concentraciones terapéuticas de anticuerpo en el SNC.

En la presente se describe un grupo de anticuerpos contra el receptor de transferrina (TfR) que puede administrar agentes terapéuticos que incluyen

anticuerpos y moléculas pequeñas a través de la BBB en dosis traza y terapéuticamente relevantes después de una sola inyección sistémica en los ratones. La distribución del anticuerpo cambió de vascular a neuronal 24 horas después de la inyección, lo que indica que una cantidad significativa de anticuerpo ha efectuado transcitosis a través de las células endoteliales cerebrales para alcanzar el parénquima. La magnitud de la captación del anticuerpo en el SNC y su distribución estaba inversamente relacionada con su afinidad de unión al TfR para las variantes anti-TfR estudiadas. La prueba del transporte de BBB se obtuvo usando un anticuerpo biespecífico que une TfR y la enzima de escisión de la proteína precursora del amiloide (APP), β–secretasa (BACE1). Una dosis sistémica única del anticuerpo anti–TfR/BACE1 biespecífico, manipulado genéticamente utilizando la metodología de la invención, no solo produjo captación del anticuerpo significativa en cerebro, sino que también redujo drásticamente los niveles de $A\beta_{1-40}$ cerebral en comparación con anti–BACE1 monoespecífico solo, lo que sugiere que la penetración de la BBB afecta la potencia del anti–BACE1. De manera similar, se demostró que un anticuerpo biespecífico que une TfR y amiloide beta (es decir, una porción de APP que resulta de la escisión BACE1 de APP, que es uno de los muchos constituyentes de las placas amiloides) era fácilmente captado en el cerebro utilizando la metodología de la invención. Los datos y experimentos descritos en la presente destacan varios mecanismos causantes detrás del incremento de la captación de un anticuerpo en el SNC, utilizando un enfoque de afinidad más baja del anticuerpo. En primer lugar, los anticuerpos anti-BBB receptor (BBB-R) de alta afinidad (por ejemplo, $antiTfR^{A}$) limitan la captación del cerebro mediante la saturación rápida del BBB-R en la vasculatura del cerebro, reduciendo así la captación de la cantidad total de anticuerpo en el cerebro y restringiendo también su distribución a la vasculatura. 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 anmticuerpo y/o de un compuesto terapéutico acoplado al mismo. Anti-TfR/BACE1 y anti-TfR/Abeta son cada uno candidatos terapéuticos promisorios y novedosos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Más aún, la tecnología de dirección biespecífica basada en transporte mediado por el receptor (RMT) abre las puertas para una amplia variedad de potenciales agentes terapéuticos para las enfermedades del SNC. La invención proporciona métodos de diseño de agentes terapéuticos que penetran la BBB y que aumentan significativamente el transporte a través de la BBB y la distribución del agente terapéutico en el SNC.

Por consiguiente, en una primera forma de realización, la invención proporciona un método para transportar un compuesto a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer un anticuerpo que se une con baja afinidad a un receptor de la barrera hematoencefálica (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. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para un trastorno neurológico. En otro aspecto, el compuesto es un agente de imagen. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no impide la unión del BBB-R a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de tales aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de forma que no inhibe la unión del TfR a la trasferrina. En otro aspecto, la BBB está en un mamífero. En otro de tales aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de tales aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de tales aspectos, el trastorno neurológico es seleccionado del grupo que consiste en

enfermedad de Alzheimer (EA), accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrópica (ELA), fibrosis cística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión traumática del cerebro. En otro aspecto, la BBB está en un ser humano.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM. En otro aspecto, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50s observados para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50 observados para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide usando el análisis de scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide empleando el análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide empleando una competición ELISA.

En otro aspecto, el BBB-R es seleccionado del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (receptor de IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 8 (LRP8), proteína relacionada con el receptor de

lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1), y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF). En otro de tales aspectos, el BBB-R es un BBB-R humano. En uno de tales apectos, el BBB-R es TfR. En otro de tales aspectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de tales apectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado al compuesto es administrado en una dosis terapéutica. En uno de tales aspectos. La dosis terapéutica es una dosis que satura el BBB-R al cual el anticuerpo se une de manera específica.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera covalente al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el compuesto está unido al anticuerpo por un ligador. En uno de tales aspectos, el ligador se puede escindir. En otro de tales aspectos, el ligador no se puede escindir. En otro de tales aspectos, el compuesto está enlazado directamente al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el anticuerpo es multiespecífico y el compuesto forma una porción del anticuerpo multiespecífico. En otro de tales aspectos, 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 se une a un antígeno cerebral. En otro de tales apectos, 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. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une a TfR y a BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une a TfR y a Abeta. En otro de tales aspectos el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera reversible al anticuerpo de modo que el compuesto es liberado del anticuerpo simultáneamente o luego del transporte BBB.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para incrementar la exposición del SNC a un compuesto, en donde el compuesto está acoplado a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R, aumentando así 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

de imagen. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no impide la unión del BBB-R a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de tales aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de forma que no inhibe la unión del TfR a la trasferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra a un mamífero. En otro de tales aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de tales aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de tales aspectos, el trastorno neurológico es seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrópica (ELA), fibrosis cística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión traumática del cerebro.

En otro aspecto, el aumento en la exposición del SNC al compuesto se mide con relación a la exposición del SNC de un compuesto acoplado con un anticuerpo típico que no tiene afinidad disminuida por el BBB-R. En otro aspecto, el aumento en la exposición al compuesto se mide como una tasa de la cantidad del compuesto encontrada en el SNC con relación a la cantidad encontrada en el suero luego de la administración. En otro de tales aspectos, el incremento en la exposición del SNC resulta en una tasa mayor que 0.1%. En otro aspecto, el aumento en la exposición del SNC al compuesto se mide con 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 imágenes. En otro aspecto, el incremento en la exposición del SNC al compuesto se mide mediante una lectura indirecta tal como una modificación de uno o más síntomas fisiológicos.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM. En otro aspecto, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad

por el BBB-R de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50s observados para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50 observados para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide usando el análisis de scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide empleando el análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide empleando una competición ELISA.

En otro aspecto, el BBB-R es seleccionado del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (receptor de IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 8 (LRP8), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1), y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF). En otro de tales aspectos, el BBB-R es un BBB-R humano. En uno de tales apectos, el BBB-R es TfR. En otro de tales aspectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro de tales apectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado al compuesto es administrado en una dosis terapéutica. En uno de tales aspectos. La dosis terapéutica es una dosis que satura el BBB-R al cual el anticuerpo se une de manera específica.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera covalente al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el compuesto está unido al anticuerpo por un ligador. En uno de tales aspectos, el ligador se puede escindir. En otro de tales aspectos, el ligador no se puede escindir. En otro de tales aspectos, el compuesto está enlazado directamente al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el anticuerpo es multiespecífico y el compuesto forma una porción del anticuerpo

multiespecífico. En otro de tales aspectos, 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 se une a un antígeno cerebral. En otro de tales apectos, 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. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une a TfR y a BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une a TfR y a Abeta. En otro de tales aspectos el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera reversible al anticuerpo de modo que el compuesto es liberado del anticuerpo simultáneamente o luego del transporte BBB.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para disminuir el aclaramiento de un compuesto administrado a un sujeto, en donde el compuesto está acoplado a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R, de modo que el aclaramiento del compuesto es disminuído. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente de imagen. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no impide la unión del BBB-R a uno o más de sus ligandos nativos. En otro aspecto, el anticuerpo se une de manera específica a TfR de modo que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto, el sujeto es un mamífero. En otro de tales aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de tales aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de tales aspectos, el trastorno neurológico es seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrópica (ELA), fibrosis cística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión traumática del cerebro.

En otro aspecto, la disminución del aclaramiento del compuesto se mide con relación al aclaramiento de un compuesto acoplado con un anticuerpo típico que no tiene afinidad disminuida por el BBB-R. En otro aspecto, la disminución del

aclaramiento del compuesto se mide con relación al aclaramiento del compuesto en ausencia de un anticuerpo acoplado.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales apectos, el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μM. En otro aspecto, el anticuerpo tienen una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales apectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas por el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas por el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50 observados para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto se une específicamente a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50s observados para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En un aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide utilizando el análisis de scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anti-BBB-R o anti-BBB-R/compuesto por el BBB-R se mide utilizando competición ELISA.

En otro aspecto, el BBB-R es seleccionado del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (receptor de IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 8 (LRP8), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1), y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF). En otro de tales aspectos, el BBB-R es un BBB-R humano. En uno de tales aspectos, el BBB-R es TfR. En

otro de tales aspectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad de TfR. En otro de tales aspectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la trasferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado a compuesto es administrado en una dosis terapéutica. En uno de tales aspectos, la dosis terapéutica es una dosis que satura el BBB-R al cual el anticuerpo se une específicamente.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera covalente al anticuerpo. En uno de tales apectos, el compuesto está unido al anticuerpo mediante un ligador. En uno de tales aspectos, el ligador se puede escindir. En otro de tales aspectos, el ligador no se puede escindir. En otro de tales aspectos, el compuesto está directamente enlazado al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el anticuerpo es multiespecífico y el compuesto forma una porción del anticuerpo multiespecífico. En otro de tales aspectos, 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. En otro de tales aspectos, 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. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une a TfR y a BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une a TfR y a Abeta. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera reversible al anticuerpo de modo que el compuesto es liberado del anticuerpo simultáneamente con o luego del transporte BBB.

Un método de incrementar la retención en el SNC de un compuesto administrado a un sujeto, en donde el compuesto está acoplado a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R, de modo que se incrementa la retención del compuesto en el SNC. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente de imagen. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no impide la unión del BBB-R a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de tales aspectos, el anticuerpo une

específicamente a TfR de modo que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto, el compuesto es administrado a un mamífero. En otro de tales aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de tales aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de tales aspectos, el trastorno neurológico es seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrópica (ELA), fibrosis cística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión traumática del cerebro.

En otro aspecto, el incremento de la retención del compuesto se mide con relación a la retención en el SNC del un compuesto acoplado con un anticuerpo típico que no tiene afinidad disminuida por el BBB-R. En otro aspecto, el incremento de la retención del compuesto en el SNC se mide como una razón de la cantidad del compuesto encontrado en el SNC con relación a la cantidad encontrada en el suero en uno o más puntos de tiempo luego de la administración. En otro de tales aspectos, el incremento de la retención en el SNC resulta en una relación mayor a 0.1% en uno o más puntos de tiempo luego de la administración. En otro aspecto, el incremento de la retención del compuesto en el SNC se mide con relación a la retención en el SNC de un compuesto en ausencia de un anticuerpo acoplado. En otro aspecto, el incremento de la retención del compuesto en el SNC se mide por imágenes. En otro aspecto, el incremento de la retención del compuesto en el SNC se mide mediante una lectura indirecta tal como una modificación de uno o más síntomas fisiológicos.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM. En otro aspecto, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acomplado al compuesto específicamente une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo

anti-TfR^{A}/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^{E}/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado a compuesto específicamente une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^{D}/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^{E}/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50 observados para el anticuerpo anti-TfR^{A}/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^{E}/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50 observados para el anticuerpo anti-TfR^{D}/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^{E}/BACE1. 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.

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

En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera covalente al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el compuesto está unido al anticuerpo mediante un ligador. En uno de tales aspectos, el ligador se puede escindir. En otro de tales aspectos, el ligador de no se puede escindir. En otro de tales aspectos, el compuesto está enlazado directamente al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el anticuerpo es multiespecífico y el compuesto forma una porción del anticuerpo multiespecífico. En otro de tales aspectos, 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. En otro de tales aspectos, 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. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y Abeta. En otro de tales aspectos, el antiecuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera reversible al anticuerpo de modo que el comopuesto es liberado del anticuerpo simultáneamente con o luego del transporte BBB.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para optimizar la farmacocinética y/o farmacodinámica de un compuesto para ser eficaz en el SNC de un sujeto, en donde el compuesto está acoplado a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R, y el anticuerpo es seleccionado de modo que su afinidad por el BBB-R luego de acoplarse al compuesto resulte en una cantidad de transporte del anticuerpo conjugado al compuesto a través de la BBB que optimiza la farmacocinética y/o 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 de imagen. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no impide la unión del BBB-R a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de tales aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de modo que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto, la BBB está en un mamífero. En otro de tales aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de tales aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de tales aspectos, el trastorno neurológico es seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrópica (ELA), fibrosis cística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión traumática del cerebro. En otro aspecto la BBB está en un humano.

En un aspecto, la optimización puede incluir la generación de una serie de complejos anticuerpo-compuesto en los cuales cada anticuerpo tiene una afinidad diferente por el BBB-R, y evaluar la farmacocinética y/o farmacodinámica de cada uno en el SNC. En otro aspecto, la optimización puede ser relativa a un estándar

conocido, tal como, pero sin limitación, la farmacocinética y/o farmacodinámica del compuesto cuando se introduce directamente en el SNC o cuando se introduce en el sujeto en ausencia de un anticuerpo anti-BBB acoplado.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 5nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales apectos, el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas por el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfRE/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50s observados para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, al anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50 observados para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. 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 por el BBB-R se mide utilizando una competición ELISA.

En otro aspecto, el BBB-R es seleccionado del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (receptor de IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 8 (LRP8), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1), y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF). En otro de tales aspectos,

el BBB-R es un BBB-R humano. En uno de tales aspectos, el BBB-R es TfR. En otro de tales aspectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad de TfR. En otro de tales aspectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la transferrina. En otro aspecto, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra en una dosis terapéutica. En uno de tales aspectos, la dosis terapéutica es una dosis que satura el BBB-R al cual el anticuerpo específicamente se une.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera covalente al anticuerpo. En otro de tales aspectos, el compuesto está unido al anticuerpo por un ligador. En uno de tales aspectos, el ligador se puede escindir. En otro de tales aspectos, el ligador no se puede escindir. En otro de tales aspectos, el compuesto está directamente unido al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una porción del anticuerpo multiespecífico. En otro de tales aspectos, 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 a un antígeno cerebral. En otro de tales aspectos, 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. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y Abeta. En otro de tales apectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera reversible al anticuerpo de modo que el compuesto es liberado del anticuerpo simultáneamente con o luego del transporte BBB.

En otra forma de realización la invención proporciona un método para tratar un trastorno neurológico en un mamífero, que comprende tratar al mamífero con un anticuerpo que se une a BBB-R y está acoplado a un compuesto, donde el anticuerpo ha sido seleccionado por tener una baja afinidad por el BBB-R y mejorar así la captación del SNC del anticuerpo y compuesto acoplado. En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente de imagen. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no impide la unión del BBB-R a uno o más de sus ligandos nativos. En

otro de tales aspectos, el anticuerpo específicamente se une a TfR de modo que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En un aspecto, el mamífero es un ser humano. En otro de tales aspectos el mamífero tiene un transtorno neurológico. En otro de tales aspectos, el trastorno neurológico es seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrópica (ELA), fibrosis cística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión traumática del cerebro.

En un aspecto, el tratamiento resulta en disminución o eliminación de los síntomas del trastorno. En otro aspecto, el tratamiento resulta en mejora del trastorno neurológico.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100μM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50s observados para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, al anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50 observados para el anticuerpo TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. 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 por el BBB-R se mide utilizando una competición ELISA.

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

En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera covalente al anticuerpo. En otro de tales aspectos, el compuesto está unido al anticuerpo por un ligador. En uno de tales aspectos, el ligador se puede escindir. En otro de tales aspectos, el ligador no se puede escindir. En otro de tales aspectos, el compuesto está directamente unido al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una porción del anticuerpo multiespecífico. En otro de tales aspectos, 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 a un antígeno cerebral. En otro de tales aspectos, 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. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y Abeta. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera reversible al anticuerpo de modo que el compuesto es liberado del anticuerpo simultáneamente con o luego del transporte BBB.

En otra forma de realización, la invención proporciona 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) debido a que tiene una deseable baja afinidad por el BBB-R.

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.

En un aspecto, el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos. En otro aspecto, el compuesto es un agente de imagen. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no impide la unión del BBB-R a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de tales aspectos, el anticuerpo se une específicamente a TfR de modo que no inhibe la unión del TfR a la transferrina. En otro aspecto la BBB está en un mamífero. En otro de tales aspectos, el mamífero es un ser humano. En otro de tales aspectos, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro de tales aspectos, el trastorno neurológico es seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrópica (ELA), fibrosis cística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión traumática del cerebro. En otro aspecto, la BBB está en un ser humano.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μM. En

otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50s observados para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, al anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre los IC50 observados para el anticuerpo TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. 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 por el BBB-R se mide utilizando una competición ELISA.

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

En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera covalente al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el compuesto está unido al anticuerpo por un ligador. En uno de tales aspectos, el ligador se puede escindir. En otro de tales aspectos, el ligador no se puede escindir. En otro de tales aspectos, el compuesto está directamente unido al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una porción del anticuerpo multiespecífico. En otro de tales aspectos, 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 a un antígeno cerebral. En otro de tales aspectos, 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. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y Abeta. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera reversible al anticuerpo de modo que el compuesto es liberado del anticuerpo simultáneamente con o luego del transporte BBB.

En otra forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un receptor de la barrera hematoencefálica (BBB-R) con baja afinidad. En un aspecto, la afinidad del anticuerpo por el BBB-R es de aproximadamente 5 nM aproximadamente 10 µM. En otro aspecto, la afinidad del anticuerpo por el BBB-R es de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 1 µM. En otro aspecto, el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de tales aspectos, el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 µM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo, cuando está acoplado a un compuesto, tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 µM. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene una afinidad por TfR entre las afinidades observadas para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene un IC50 por TfR entre las IC50s observadas para el anticuerpo TfR^A/BACE1 y el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo acoplado al compuesto específicamente se une a TfR y tiene un IC50 for TfR entre los IC50s observados para el anticuerpo anti-TfR^D/BACE1 y el anticuerpo anti-

TfR^E/BACE1. 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 por el BBB-R se mide utilizando una competición ELISA.

En otro aspecto, el BBB-R es seleccionado del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (receptor de IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 8 (LRP8), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1), y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF). En uno de tales aspectos, el BBB-R es TfR. En otro de tales aspectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad de TfR. En otro de tales aspectos, el BBB-R es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a la trasferrina. En otro de tales aspectos, el BBB-R es un BBB-R 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 de imagen. En otro aspecto, el compuesto está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo está marcado. En otro aspecto, el anticuerpo no impide la unión del BBB-R a uno o más de sus ligandos nativos. En otro de tales aspectos, el anticuerpo específicamente se une a TfR de modo que no inhibe la unión del TfR a la transferrina.

En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera covalente al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el compuesto está unido al anticuerpo por un ligador. En uno de tales aspectos, el ligador se puede escindir. En otro de tales aspectos, el ligador no se puede escindir. En otro de tales aspectos, el compuesto está directamente unido al anticuerpo. En uno de tales aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto forma una porción del anticuerpo multiespecífico. En otro de tales aspectos, 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 a un antígeno cerebral. En otro de tales aspectos, 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. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y BACE1. En otro de tales aspectos, el anticuerpo multiespecífico une TfR y Abeta. En otro de tales apectos, el anticuerpo multiespecífico está marcado. En otro aspecto, el compuesto está acoplado de manera reversible al anticuerpo de modo que el compuesto es liberado del anticuerpo simultáneamente con o luego del transporte BBB.

En otro aspecto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo con una región de unión al antígeno que se une al BBB-R, incluyendo, pero sin limitación, Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv. En otro aspecto, es anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

En otra forma de realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R para la fabricación de un medicamento para tratar un desorden neurológico. Cualquiera de los antes descritos anticuerpos de baja afinidad anti-BBB-R o cualquiera de los anticuerpos de baja afinidad anti-BBB-R descritos en otras partes de este documento puede ser usado en el método.

En otra forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R para uso en el tratamiento de un trastorno neurológico. Cualquiera de los antes descritos anticuerpos de baja afinidad anti-BBB-R o cualquiera de los anticuerpos de baja afinidad anti-BBB-R descritos en otras partes de este documento puede ser usado en el método. En consecuencia, en un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un receptor de la barrera hematoencefálica (BBB-R), donde la afinidad del anticuerpo por el BBB-R es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM (por ejemplo, de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 1 μM). Opcionalmente, el BBB-R es seleccionado del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (receptor de IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 8 (LRP8), y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF). Opcionalmente, el anticuerpo está acoplado con un compuesto terapéutico, tal como un fármaco para trastornos neurológicos. En una forma de realización, el anticuerpo es 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 a un antígeno cerebral, por ejemplo donde el

antígeno cerebral es seleccionado del grupo que consiste en beta-secretasa 1 (BACE1), beta amiloide (Abeta), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), Tau, apolipoproteína A3 (ApoE3), alipoproteina 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. El anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo multiespecífico) incluye fragmentos de anticuerpo y anticuerpos de longitud completa.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para transportar un compuesto terapéutico, tal como un fármaco para trastornos neurológicos, a través de la barrera hematoencefálica, que comprende exponer el anticuerpo anti-BBB-R acoplado con 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 método puede estar en un mamífero, por ejemplo uno con un trastorno neurológico, ejemplos del cual incluyen enfermedad de Alzheimer (EA, incluyendo, pero sin limitación, deterioro cognitivo leve y EA prodrómica), accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrópica (ELA), fibrosis cística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer (por ejemplo, cáncer que afecta al SNC o al cerebro) y lesión traumática del cerebro.

La invención se refiere adicionalmente a un método para producir un anticuerpo útil para transportar un compuesto terapéutico como un fármaco para trastornos neurológicos a través de la barrera hematoencefálica, que comprende seleccionar un anticuerpo contra un receptor de la barrera hematoencefálica (BBB-R) debido a que tiene una afinidad por el BBB-R que es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10μM. En una forma de realización el anticuerpo es seleccionado de un panel de anticuerpos porque tiene la afinidad deseada. En forma alternativa, o adicionalmente, el anticuerpo se manipula genéticamente para tener la afinidad deseada. El método comprende además acoplar el anticuerpo con un compuesto terapéutico tal como un fármaco para trastornos neurológicos. Por ejemplo, el método puede comprender 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.

La invención proporciona adicionalmente un método para tratar un trastorno neurológico en un mamífero, que comprende tratar al mamífero con un anticuerpo multiespecífico que se une al receptor de la barrera hematoencefálica (BBB-R) y a un antígeno cerebral, donde al anticuerpo anti-BBB-R ha sido seleccionado por tener una baja afinidad por el BBB-R y mejorar de este modo la captación del anticuerpo anti-antígeno cerebral. Opcionalmente, el anticuerpo multiespecífico se une al receptor de transferrina (TfR) y BACE1 o Abeta.

Se entenderá que cualquiera de los métodos precedentes y composiciones de la invención pueden ser combinados entre sí y/o con aspectos adicionales de la invención descritos en este documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A–E ilustran la captación cerebral significativa del anticuerpo anti–TfR administrado sistémicamente. La Fig. 1A muestra la captación cerebral después de la administración IV de dosis traza (aproximadamente 50 µg/kg) de [^{131}I]anti–TfR^{A} y [^{125}I] IgG control en ratones y se cuantificó como un porcentaje promedio de la dosis inyectada por gramo de cerebro a 5, 30 min., 1, 4, 24, 48, y 72 horas después de la inyección IV (n=6). La captación de [^{131}I]anti–TfR^{A} fue disminuida mediante inyección con 4 mg/kg de anti–TfR^{A} no marcado (frío). La Fig. 1B muestra la cuantificación de la captación de anticuerpo promedio en el cerebro 1 y 24 horas después de una inyección IV de 20 mg/kg de IgG control o anti–TfR^{A} (***p=0,0002, n=10). La Fig. 1C muestra la razón del porcentaje promedio de las concentraciones de cerebro a suero (**p=0,003, n=10). Las Figs. 1D y 1E ilustran la tinción inmunohistoquímica de las secciones de cerebro después de la inyección IV con anti–TfR^{A} (Fig. 1D, paneles superiores), que muestra la co–localización con anti–colágeno IV, un marcador vascular (panel inferior). La inyección IV con IgG control (Fig. 1E, paneles superiores) exhibe la distribución vascular en el cerebro solo después de 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 anticuerpos anti–TfR y grado de captación cerebral están inversamente relacionados cuando se administran en una dosis terapéuticamente relevante (20 mg/kg) en comparación con una dosis baja de traza (aproximadamente 50 µg/gk). La Figura 2A presenta una unión competitiva ELISA en la cual se usan concentraciones en aumento de variantes de anticuerpos anti-TfR^{A,B,C,D,E} para competir con TfR^{A} biotinilado por unión a TfR. La

competición ELISA anti-TfR se llevó a cabo en placas Maxisorp (Neptune, N.J.) recubiertas con 2.5 µg/ml de dominio extracelular TfR murino purificado, en PBS a 4°C durante la noche. Las placas fueron lavadas con PBS/Tween 20 0.05% y bloqueadas usando buffer de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Una titulación de anti-TfR^A, anti-TfR^B, anti-TfR^C o anti-TfR^D (1:3 dilución serial) fue combinada con anti-TfR^A biotinilado (concentración final 0.5 nM) y añadida a la placa durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween 20 0.05%, y se añadió HRP-estreptavidina (Southern Biotech, Birmingham) a la placa e incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con PBS Tween 20 0.05%, y el anti-TfR^A biotinilado unido a la placa fue detectado usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Los resultados en la Figura 2A presentan datos de un experimento individual en el cual todas las cinco variantes anti-TfR fueron evaluadas por separado. Los valores IC50 determinados a partir de estos datos se muestran en la Tabla 2. La Fig. 2B representa la cuantificación de la captación cerebral promedio luego de inyección IV de dosis traza (aproximadamente 50 µg/kg) de variantes [^{125}I]anti-$TfR^{A,B,C,D,E}$ luego de 5 min, 1, 4, 6 y 24 horas (n=3). Los resultados en la Figura 2B presentan datos de un experimento individual en el cual todas las cinco variantes anti-TfR fueron evaluadas por separado. La Fig. 2C muestra la cuantificación de la captación cerebral promedio luego de 20 mg/kg de inyección IV de variantes anti-TfR a 1 y 24 horas, usando los métodos descritos con relación a la Figura 1B. El experimento fue replicado bajo las mismas condiciones usando anti-TfR^E, y todos los resultados se presentan en la Figura 2C. La Fig. 2D es un modelo que ilustra la relación inversa entre la afinidad y la captación cerebral. La Fig. 2E es una comparación de la tinción inmunohistoquímica de secciones de cerebro luego de inyección IV ya sea con el anticuerpo anti-TfR^A de alta afinidad o el anticuerpo anti-$TfR^{B,C,D}$ de más baja afinidad, que muestra diferencias en la distribución de anticuerpo (la tinción en los paneles de la izquierda es para anti-TfR solo) y el grado de co-localización con NeuN (tinción en los paneles de la derecha es tanto para anti-TfR como para NeuN). Barra de escala = 50 µm. La Fig. 2F es una imagen altamente ampliada, representativa, de la localización de anti-TfR^D en las neuronas (como lo indica la tinción NeuN); estos datos muestran que el anti-TfR^D y NeuN se colocalizan y, de esta manera, el anti-TfR^D atraviesa la BBB e interactúa con las neuronas, mientras el anti-TfRA principalmente se localiza en la vasculatura en contraposición a las neuronas. Barra de escala = 20 µm.

Las Figuras 3A–G muestran que un anticuerpo anti–TfR/BACE1 biespecífico inhibe Aβ in vitro y se acumula en el cerebro. La Fig. 3A es un modelo esquemático de un anticuerpo biespecífico que fue manipulado genéticamente para unirse a TfR y β–secretasa (BACE1). La Fig. 3b muestra la afinidad de unión por TfR de los anti–TfR^A y anti–TfR^A/BACE1 originales medidos por el ensayo de ELISA de competición anti-TfR antes descrito para la Figura 2A. La Fig. 3C muestra la cuantificación de los niveles de Aβ producidos por las células HEK293, que expresan APP de manera estable, después del tratamiento con anti–TfR^A/BACE1, anti–BACE1, e IgG control en un ensayo basado en células. La habilidad de los anticuerpos para inhibir la producción de Aβ1-40 en células HEK293 que expresan de manera estable proteína precursora de amiloide humana de tipo salvaje, fue evaluada como sigue. Células HEK293-APPWT fueron sembradas durante la noche a una densidad de 3×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. 50 µl de medio fresco (DMEM + 10% FBS) conteniendo un anticuerpo anti-BACE1 o un anticuerpo IgG1 control fueron incubados con las células durante 24 horas a 37°C. El medio celular fue cosechado y ensayado para establecer la presencia de Aβ1-40 usando el ensayo Aβ1-40 HTRF® (CisBio) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores Aβ1-40 fueron normalizados para viabilidad celular, como se determina usando el ensayo CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay (Promega). Los experimentos se llevaron a cabo por lo menos menos tres veces, y cada punto en cada experimento fue repetido por duplicado. La Fig. 3D ilustra la cuantificación de la captación cerebral promedio después de dosis traza de anticuerpo marcado con [^{125}I] a 30 min, 6, 24, y 48 horas después de la inyección IV en ratones (n=4). La Fig. 3E muestra la cuantificación de la captación de anticuerpo promedio en el cerebro y en la Fig. 3F la relación promedio de cerebro a suero a 1, 12, 24, y 48 horas después de una inyección IV de 20 mg/kg de anticuerpo en ratones (n=10). Los experimentos en las Fig. 3E y 3F fueron llevados a cabo usando el mismo protocolo que el experimento descrito con respecto a la Figura 1B. La Fig. 3G muestra la tinción inmunohistoquímica de las secciones de cerebro de ratones 24 horas después de la inyección IV con anti–TfR/BACE1 (paneles izquierdos) o IgG control (paneles derechos). La co–localización del anticuerpo con NeuN se observa después del tratamiento con anti–TfR^A/BACE1 (la tinción neuronal NeuN coincide con la tinción del anticuerpo que penetra) pero está ausente en los ratones tratados con IgG control (solamente se observa el patrón de tinción neuronal NeuN, no la tinción del anticuerpo).

Las Figures 4A–E muestran que una dosis sistémica única de anti–TfR^{A}/BACE1 reduce significativamente $A\beta_{1-40}$ central y periférica. Las Figs. 4A–D muestran la cuantificación de los niveles de $A\beta_{1-40}$ cerebrales (A,B) y plasmáticos (C,D) después de una inyección IV de 25 mg/kg o 50 mg/kg de IgG control, anti–BACE1, o anti–TfR/BACE1. En breves palabras, para las mediciones Abeta1-40, se homogenizaron hemi-cerebros en buffer de clorhidrato de guanidina 5M y las muestras se giraron durante 3 horas a temperatura ambiente antes de la dilución (1:10) en caseína 0.25%, EDTA 5mM (pH 8.0) y PBS conteniendo aprotinina recién añadida (20 mg/mL) y leupeptina (10 mg/ml). Los homogenatos diluidos fueron centrifugados a 14000 rpm durante 20 min y se aislaron los sobrenadantes para la medición de Abeta1-40. Para las mediciones de concentración de anticuerpo, se homogenizó el correspondiente hemi-cerebro de cada ratón en 1% NP-40 como se describió antes. La sangre entera fue colectada en tubos microcontenedores con EDTA (BD Diagnostics) antes de la perfusión, centrifugada a 5000 x g durante 15 minutos, y el sobrenadante fue aislado para medir las concentraciones de Abeta1-40 y anti-TfR/BACE1 de ratón en plasma. Las concentraciones de Abeta1-40 total de ratón en plasma y cerebro fueron determinadas utilizando ELISA sándwich siguiendo procedimientos similares descritos anteriormente. Anticuerpo policlonal de conejo específico para el término C de Abeta-40 (Millipore, Bedford MA) fue recubierto sobre placas, y para la detección se usó anticuerpo monoclonal Abeta anti-ratón biotinilado M3.2 (Covance, Dedham MA). El ensayo tuvo un límite inferior de valores de cuantificación de 1.96 pg/ml en plasma y 39.1 pg/g en cerebro. El análisis estadístico de las diferencias entre los grupos experimentales fue llevado a cabo utilizando una prueba t no emparejada de dos colas. * representa significancia en comparación con el IgG 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 Fig. 4E muestra la reducción de $A\beta_{1-40}$ promedio a partir de los datos de (A–D) calculados como un porcentaje de los niveles de $A\beta_{1-40}$ con respecto a ratones inyectados con IgG control.

Las Figuras 5A–B ilustran las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana y pesada del clon YW412.8 anti-BACE1 obtenidas de una clase sin tratamiento de la biblioteca de despliegue en fago de diversidad natural y las formas de afinidad madura de YW412.8. La Fig. 5A ilustra los alineamientos de secuencia de la cadena liviana variable (VL) (SEQ ID NOs. 1–6). La Fig. 5B ilustra los alineamientos de secuencia de la cadena pesada variable (VH) (SEQ ID Nos.

7–8). En ambas figuras, las secuencias de HVR para cada clon se indican con las regiones recuadradas, la primera caja indica HVR–L1 (Fig. 5A) o HVR–H1 (Fig. 5B), la segunda caja indica HVR–L2 (Fig. 5A) o HVR–H2 (Fig. 5B), y la tercera caja indica HVR–L3 (Fig. 5A) o HVR–H3 (Fig. 5B).

Las Figuras 6A–B ilustran las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana y pesada del clon Fab 12 obtenido de una clase sin tratamiento de la biblioteca de despliegue en fago de diversidad natural y las formas de afinidad madura de Fab 12. La Fig. 6A ilustra los alineamientos de secuencia de la cadena liviana (SEQ ID NOs. 9–12). La Fig. 6B ilustra los alineamientos de secuencia de la cadena pesada (SEQ ID NO. 13). En ambas figuras, las secuencias de HVR para cada clon se indican con las regiones recuadradas; la primera caja indica HVR–L1 (Fig. 6A) o HVR–H1 (Fig. 6B), la segunda caja indica HVR–L2 (Fig. 6A) o HVR–H2 (Fig.6B), y la tercera caja indica HVR–L3 (Fig. 6A) o HVR–H3 (Fig. 6B).

Las Figuras 7A–B ilustran la cadena pesada (Fig. 7A; SEQ ID NO. 14) y cadena liviana (Fig. 7B; SEQ ID NO. 15) de un ejemplo de anticuerpo anti–Abeta.

Las Figuras 8A-B ilustran la cuantificación de anti-$TfR^{A,B,C,D,E}$ en el suero (Figura 8A) y cerebro (Figura 8B) luego de la administración de una dosis terapéutica única en ratones. Para todos los estudios se usaron ratones hembra C57B/6 de tipo salvaje, de seis-ocho semanas de edad. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con 20 mg/kg de variantes Anti-TfR o IgG control. Se midieron los niveles de anticuerpo en cerebro y suero a 1 y 12 horas y 1, 2, 4, 5, 6 y 8 días luego de la inyección. El volumen total de la inyección no excedió los 260 µL y los anticuerpos fueron diluidos en D-PBS (Invitrogen) cuando fue necesario. El experimento se llevó a cabo usando el mismo protocolo que el experimento cuyos resultados se muestran en la Figura 1B.

Las Figuras 9A-E ilustran los diversos grados a los cuales los anticuerpos biespecíficos anti-$TfR^{A,D,E}$/BACE1 se acumulan en el cerebro e inhiben la producción de Aβ in vivo. La Figura 9A ilustra los resultados de un ensayo de competición ELISA anti-TfR utilizando anti-$TfR^{A,D,E}$/BACE1, siguiendo el mismo procedimiento de ensayo que el descrito en la Figura 2A. Los valores IC50 determinados a partir de estos datos se muestran en la Tabla 3. Las Figuras 9B y 9D cuantifican la cantidad de anticuerpo observado (9B) y la cantidad de Abeta1-40 (9d) observada en el plasma a 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 ilustra la cuantificación de la captación promedio del cerebro, y la Figura 9E ilustra la cantidad de Abeta1-40 observada en los cerebros de los mismos ratones tratados

a 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días después del tratamiento. Para todos los estudios se emplearon ratones hembra C57B/6 de tipo salvaje, de seis a ocho semanas de edad. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con 50 mg/kg de variantes anti-TfR/BACE1, IgG control o anti-BACE1. Luego del tiempo indicado, los ratones fueron perfundidos con D-PBS, y se midió la concentración del anticuerpo en cerebro y plasma para cada animal como se describió antes. El ensayo fue llevado a cabo como se describió para la Figura 4.

Las Figuras 10 y 11 muestran los diversos grados a los cuales los anticuerpos biespecíficos anti-$TfR^{A,D,E}$/Abeta se acumulan en el cerebro de los ratones PSAPP (Figura 10) y ratones de tipo salvaje (Figura 11). Las Figuras 10A y 11A ilustran la cuantificación de la cantidad de anticuerpo observada en el plasma 1 día luego de una inyección i.p. de 50 mg/kg de anticuerpos en ratones (n = 4-6). Las Figuras 10B y 11B cuantifican la captación promedio del cerebro en los mismos ratones tratados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

La "barrera hematoencefálica" o "BBB" se refiere a la barrera fisiológica entre la circulación periférica y el cerebro y la médula espinal que se forma por uniones estrechas dentro de las membranas plasmáticas endoteliales capilares del cerebro, lo que crea una barrera estrecha que restringe el transporte de las moléculas al cerebro, aun de moléculas muy pequeñas tales como urea (60 Dalton). La barrera hematoencefálica dentro del cerebro, la barrera hemato-espinal dentro de la médula espinal, y la barrera hemato–retiniana dentro de la retina son barreras capilares contiguas dentro del SNC, y se denominan colectivamente en la presente como la barrera hematoencefálica o BBB. La BBB también abarca la barrera sangre–CSF (plexo coroide) donde la barrera está compuesta de células del epéndimo más que de células endoteliales capilares.

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

Un "receptor de la barrera hematoencefálica" (abreviado como "BBB–R" en la presente) es una proteína del receptor de transmembrana expresado en las células endoteliales que es capaz de transportar moléculas a través de la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de BBB–R en la presente incluyen: receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo

insulina (IGF–R), receptores de la lipoproteína de baja densidad que incluyen sin limitación, proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1) y proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 8 (LRP8), y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF). Un ejemplo de BBB–R de la presente es el receptor de transferrina (TfR).

El "receptor de transferrina" ("TfR") es una glicoproteína de transmembrana (con un peso molecular de aproximadamente 180.000) compuesto de dos subunidades unidos de disulfuro (cada uno de peso molecular aparente de aproximadamente 90.000) involucrado en la absorción de hierro en los vertebrados. En una forma de realización, el TfR en la presente es TfR humano que comprende la secuencia de aminoácidos, como por ejemplo en Schneider et al. *Nature* 311: 675 – 678 (1984).

Un "trastorno neurológico" como se usa en la presente se refiere a una enfermedad o trastorno que afecta el SNC y/o que tiene una etiología en el SNC. Los ejemplos de enfermedades o trastornos del SNC incluyen, pero sin limitación, neuropatía, amiloidosis, cáncer, una enfermedad o trastorno ocular, infección viral o microbiana, inflamación, isquemia, enfermedad neurodegenerativa, convulsiones, trastornos de conducta, y una enfermedad del almacenamiento lisosómico. Para el fin de esta aplicación, se considerará que el SNC incluye el ojo, que normalmente está secuestrado del resto del cuerpo por la barrera hemato–retiniana. Los ejemplos específicos de los trastorno neurológicos incluyen, pero sin limitación, enfermedades neurodegenerativas (que incluyen, pero sin limitación, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome pospoliomielitis, síndrome de Shy–Draeger, atrofia olivopontocerebelar, enfermedad de Parkinson, atrofia multisistémica, degeneración estriatonigral, tauopatías (que incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear), enfermedades priónicas (que incluyen, pero sin limitación, encefalopatía espongiforme bovina, encefalopatía espongiforme ovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt–Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann–Straussler–Scheinker, enfermedad debilitante crónica, e insomnio familiar fatal), parálisis bulbar, enfermedad de la neurona motora, y trastornos heterodegenerativos del sistema nervioso (que incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis ceroidea neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del cabello rizado 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 (que incluye, pero sin limitación, enfermedad de Pick, y ataxia espinocerebelar), cáncer (por ejemplo, del SNC y/o cerebro, que incluye metástasis cerebral resultante del cáncer en otra parte del cuerpo).

Un "fármaco para trastornos neurológicos" es un fármaco o agente terapéutico que trata uno o más trastornos neurológico(s). Los fármacos para trastornos neurológicos de la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, péptidos, proteínas, ligandos naturales de uno o más blancos del SNC, versiones modificadas de ligandos naturales de uno o más blancos del SNC, aptámeros, ácidos nucleicos inhibidores (es decir, ARN inhibidores pequeños (ARNsi) y ARN de horquilla corta RNA (ARNsh)), ribozimas y moléculas pequeñas, o fragmentos activos de cualquiera de los anteriores. Los ejemplos de fármacos para trastornos neurológicos de la invención se describen en la presente e incluyen, pero sin limitación: anticuerpos, aptámeros, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos inhibidores y moléculas pequeñas y fragmentos activos de cualquiera de los anteriores sea por sí mismos o que reconocen específicamente y/o actúan sobre (es decir, inhiben, activan o detectan) un antígeno o molécula blanco del SNC tal como, pero sin limitación, proteína precursora del amiloide o porciones de estas, amiloide beta, beta–secretasa, gamma–secretasa, tau, alfa–sinucleína, parkina, huntingtina, DR6, presenilina, ApoE, glioma u otros marcadores de cáncer del SNC, y neurotrofinas. Los ejemplos no limitantes de los fármacos para trastornos neurológicos y los trastornos que se pueden tratar con ellos se proporcionan en la siguiente tabla:

TABLA 1: **Ejemplos no limitantes de los fármacos para trastornos neurológicos y los correspondientes trastornos que se pueden tratar con ellos**

Fármaco	**Trastorno neurológico**
Anticuerpo anti–BACE1	Alzheimer, lesión cerebral aguda y crónica, accidente cerebrovascular
Anticuerpo Anti–Abeta	Enfermedad de Alzheimer
Neurotrofina	Accidente cerebrovascular, lesión cerebral aguda, lesión de la médula espinal
Factor neurotrófico derivado de	Lesión cerebral crónica

cerebro (BDNF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF–2)	(Neurogénesis)
Anticuerpo anti–receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	Cáncer de cerebro
Factor neural derivado de línea celular glial (GDNF)	Enfermedad de Parkinson
Factor neurotrófico derivado de 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 (por ejemplo, trastuzumab)	Metástasis de cerebro de cáncer positivo HER2

Un "agente de imagen" es un compuesto que tiene una o más propiedades que permiten que su presencia y/o localización sea detectada directa o indirectamente. Ejemplos de tales agentes de imagen incluyen proteínas y compuestos de molécula pequeña que incorporan un residuo marcado que permite la detección.

Un "antígeno del SNC" o "antígeno cerebral" es un antígeno expresado en el SNC, que incluye el cerebro, al que se puede dirigir un anticuerpo o molécula pequeña. Los ejemplos de tales antígenos incluyen, sin limitación: beta–secretasa 1 (BACE1), amiloide beta (Abeta), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa–sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), 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. En una forma de realización, el antígeno es BACE1.

El término "BACE1", como se usa en la presente, se refiere a cualquier beta–secretasa 1 nativa (también llamada enzima de escisión de la proteína precursora de amiloide 1 del sitio β, proteasa aspártica asociada a membrana 2, memapsina 2, aspartil proteasa 2 o Asp2) de cualquier fuente de vertebrado, que

incluye mamíferos tales como primates (*por ejemplo,* seres humanos) y roedores (*por ejemplo,* ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término abarca BACE1 no procesada de "longitud completa" así como cualquier forma de BACE1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de BACE1, *por ejemplo,* variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de polipéptido de BACE1 es la secuencia para el BACE1 humano, isoforma A informado en Vassar *et al.*, *Science* 286:735–741 (1999), que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. Existen varias isoformas diferentes de BACE1 humano que incluyen las isoformas B, C y D. *Ver* UniProtKB/Swiss–Prot Entry P56817, que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

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 unir BACE1 con afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a BACE1. En una forma de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti–BACE1 a una proteína no BACE1, no relacionada es menos de aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a BACE1 medido, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une a BACE1 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM, o ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti–BACE1 se une a un epítope de BACE1 que está conservado entre BACE1 de especies e isoformas diferentes. En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo que se une al epítope de BACE1 unido por el anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31. En otras formas de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un exositio de BACE1 localizado en el dominio catalítico de BACE1. En una forma 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 la presente a modo de referencia en su totalidad, (es decir, 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, mezclados, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A y L11A) por la unión a BACE1. Los ejemplos de las secuencias de anticuerpo de BACE1 se ilustran en las Fig. 5A–B y Fig. 6A–B. Un ejemplo de anticuerpo de la presente

comprende los dominios variables del anticuerpo YW412.8.31 (por ejemplo, como en las Figs. 5A–B).

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

El término "anticuerpo" en la presente se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), formados de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos siempre que ellos exhiban la actividad biológica deseada.

"Fragmentos de anticuerpos" en la presente comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que retiene la capacidad de unirse al antígeno. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos de fragmentos de anticuerpo.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítope, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, tales variantes generalmente están presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones del anticuerpo policlonal que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que estos no están contaminados con otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se interpreta que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales usados de acuerdo con la presente invención se pueden realizar por el método de hibridoma primero descripto por Kohler *et al., Nature*, 256:495 (1975), o se puede obtener por métodos de ADN recombinante (ver, *por ejemplo,* Patente de los Estados Unidos Nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpo de fago mediante las

técnicas descriptas por ejemplo, en Clackson *et al., Nature,* 352:624–628 (1991) y Marks *et al., J. Mol. Biol.*, 222:581–597 (1991). Los ejemplos específicos de anticuerpos monoclonales en la presente incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos humanos, que incluyen sus fragmentos de unión al antígeno.

Los anticuerpos monoclonales de la presente específicamente incluyen anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga con las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadena(s) es idéntica u homóloga con las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de otra especie particular o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que estos muestren la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos Nº 4.816.567; Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851–6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión al antígeno del dominio variable derivado de las secuencias de la región constante de primate no humano (*por ejemplo,* monos del viejo mundo, tal como mono babuino, rhesus o cynomolgus) y humano (Patente de los Estados Unidos Nº 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo,* murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región hipervariable del receptor están reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están reemplazados con los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se pueden realizar para refinar adicionalmente el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en que el total o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y total o sustancialmente todas las FR son

las de una secuencia de inmunoglobulina humana, excepto para las sustituciones de la FR indicados anteriormente. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina, normalmente 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 la presente es uno que comprende una estructura de secuencia de aminoácidos que corresponde con la estructura de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que se puede obtener de una célula B humana, e incluye fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos humanos. Tales anticuerpos se pueden identificar o realizar por una variedad de técnicas, que incluyen, pero sin limitación: producción por animales transgénicos (*por ejemplo,* ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena (ver, *por ejemplo,* 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 las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807)); selección de las bibliotecas de despliegue en fago que expresan anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano (ver, 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 los Estados Unidos Nº 5.565.332 y 5.573.905); generación por medio de células B activadas *in vitro* (ver Patentes de los Estados Unidos Nº 5.567.610 y 5.229.275); y aislamiento de los hibridomas productores de anticuerpo humano.

Un "anticuerpo multiespecífico" en la presente es un anticuerpo que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopes diferentes. Los ejemplos de anticuerpos multiespecíficos pueden unirse a BBB–R y un antígeno cerebral. Los anticuerpos multiespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (*por ejemplo,* anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$). Los anticuerpos manipulados genéticamente con dos, tres o más (por ejemplo, cuatro) sitios de unión al antígeno funcional también están contemplados (ver, por ejemplo, Solicitud de los Estados Unidos Nº 2002/0004587 A1, Miller *et al.*). Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser preparados como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos en la presente incluyen "variantes de la secuencia de aminoácidos" con unión al antígeno o actividad biológica alterada. Los ejemplos de tales alteraciones de aminoácidos incluyen anticuerpos con aumento de afinidad por el antígeno (por ejemplo, anticuerpos de "afinidad madura"), y anticuerpos con la región Fc alterada, si está presente, por ejemplo, con citoxicidad celular dependiente del anticuerpo alterada (aumentada o disminuida) (ADCC) y/o citoxicidad dependiente del complemento (CDC) (ver, por ejemplo, WO 00/42072, Presta, L. y WO 99/51642, Iduosogie et al.); y/o vida media sérica aumentada o disminuida (ver, por ejemplo, WO00/42072, Presta, L.).

Una "variante de afinidad modificada" tiene una o más región hipervariable o residuos de la estructura sustituidos de un anticuerpo original (*por ejemplo,* de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano original) que altera la afinidad (aumenta o reduce). En una forma de realización, la o las variantes resultantes seleccionadas para mayor desarrollo tendrán afinidad reducida para el BBB–R de acuerdo con la presente invención. Una manera conveniente para generar tales variantes de sustitución usa el despliegue en fago. En breves palabras, varios sitios de la región hipervariable (*por ejemplo,* 6–7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones amino posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se despliegan de modo monovalente a partir de partículas de fago filamentosos como fusiones del producto del gen III de M13 empaquetado en cada partícula. Las variantes desplegadas en fago luego se analizan para determinar su actividad biológica (*por ejemplo,* afinidad de unión). A fin de identificar sitios de la región hipervariable candidato para la modificación, se puede realizar mutagénesis de barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. En forma alternativa o adicional, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno–anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y su blanco. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente. Una vez que se generan tales variantes, el panel de las variantes se somete a análisis y los anticuerpos con afinidad alterada se pueden seleccionar para el posterior desarrollo.

El anticuerpo en la presente se puede conjugar con una "molécula heteróloga" por ejemplo para aumentar la vida media o estabilidad o mejorar de otro modo el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede ligar a una de una variedad de polímeros no proteináceos, *por ejemplo,* polietilenglicol (PEG),

polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilen glicol y polipropilen glicol. Los fragmentos de anticuerpo, tal como Fab', ligados a una o más moléculas de PEG son un ejemplo de la forma de realización de la invención.

El anticuerpo en la presente puede ser una "variante de glicosilación" de modo que se altera cualquier carbohidrato unido a la región de Fc, si está presente. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato maduro que carece de fucosa unida a una región de Fc del anticuerpo se describen en la Solicitud de patente de los Estados Unidos Nº US 2003/0157108 (Presta, L.). Ver también US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N–acetilglucosamina (GlcNAc) bisecante en el carbohidrato unido a una región de Fc del anticuerpo se refieren en WO 2003/011878, Jean–Mairet *et al.* y Patente de los Estados Unidos Nº 6.602.684, Umana *et al.* Los anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región de Fc del anticuerpo se informan en WO 1997/30087, Patel *et al.* Ver, también, WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a los anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región de Fc de este. Ver también US 2005/0123546 (Umana *et al.*) que describe los anticuerpos con glicosilación modificada.

El término "región hipervariable" cuando se usan en la presente se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (*por ejemplo,* residuos 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97 (L3) en el dominio variable de la cadena liviana y 31–35 (H1), 50–65 (H2) y 95–102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (*por ejemplo,* residuos 26–32 (L1), 50–52 (L2) y 91–96 (L3) en el dominio variable de la cadena liviana y 26–32 (H1), 53–55 (H2) y 96–101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901–917 (1987)). Residuos de "estructura" o "FR" son los residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable definidos en la presente.

Un "anticuerpo de longitud completa" es uno que comprende una región variable de unión al antígeno así como un dominio constante de la cadena liviana (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo,

dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variantes de la secuencia de aminoácidos de esta.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (como se define en la presente) que no está conjugado a una molécula heteróloga, tal como un residuo citotóxico, polímero, o radiomarca.

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

De acuerdo con las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa se pueden asignar a "clases" diferentes. Existen cinco clases principales de anticuerpos de longitud completa: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de estos se pueden dividir en "subclases" (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las clases diferentes de anticuerpos se denominan alfa, delta, epsilon, gamma, y mu respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de clases diferentes de inmunoglobulinas son bien conocidas.

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

Como se usa en la presente, "unión específica" o "se une específicamente a" se refiere a un anticuerpo que se une en forma selectiva o preferencial a un antígeno. La afinidad de unión se determina generalmente mediante un ensayo estándar, tal como análisis de Scatchard, o técnica de resonancia del plasmón superficial (por ejemplo, por medio de BIACORE®).

Un "anticuerpo que se une al mismo epítope" como 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 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 50% o más. En una forma de realización, un anticuerpo anti–BACE1 se une al epítope de BACE1 unido por YW412.8.31.

El término "agente citotóxico" como se usa en la presente se refiere a una sustancia que inhibe o impide una función celular y/o causa muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, isótopos radiactivos (*por ejemplo*, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y los isótopos radiactivos de Lu), agentes o fármacos quimioterapéuticos (*por ejemplo*, metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes de intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y sus fragmentos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de pequeñas moléculas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de plantas o animal, que incluyen sus fragmentos y/o variantes.

Una "cantidad efectiva" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios para obtener el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "región Fc" de la presente se usa para definir una región C–terminal de una cadena pesada de la inmunoglobulina, que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de la secuencia nativa y regiones Fc de la variante. En una forma de realización, la región Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C–terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique de otro modo en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región de Fc o región constante es acorde con el sistema de numeración EU, también llamado el índice EU, que se describe en Kabat et al.,

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

"Estructura" o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3, y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR generalmente 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, que incluyen pero sin limitación a una marca o agente citotóxico. Opcionalmente tal conjugación es por medio de un ligador.

Un "ligador" como se usa en la presente es una estructura que conecta en forma covalente o no covalente el anticuerpo anti–BBB–R a la molécula heteróloga. En ciertas formas de realización, un ligador es un péptido. En otras formas de realización, un ligador es un ligador químico.

Una "marca" es un marcador acoplado con el anticuerpo de la presente y usado para la detección o visualización de imagen. Los ejemplos de tales marcas incluyen: radiomarca, un fluoróforo, un cromóforo, o una etiqueta de afinidad. En una forma de realización, la marca es una radiomarca usada para el examen médico por imagen, por ejemplo tc99m o I123, o una marca de espín para visualización de imagen de resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocido como imagen de resonancia magnética nuclear, mri), tal como yodo–123 nuevamente, 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 sin limitación, animales domesticados (tales como vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (tales como ratones y ratas). En ciertas formas de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su ambiente natural. En algunas formas de realización, un anticuerpo se purifica a más de 95% o 99% de pureza determinado, por ejemplo, por métodos electroforéticos (por ejemplo, SDS–PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o fase inversa). Para la revisión de los métodos para la evaluación de la pureza del anticuerpo, ver, por ejemplo, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79–87 (2007).

El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o precauciones concernientes al uso de tales productos terapéuticos.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la presente sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se debe administrar la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, diferente de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un buffer, excipiente, estabilizante, o conservante.

Como se usa en la presente, "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales tales como "tratar" o "que trata") se refieren a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo por tratar, y se puede realizar tanto para la profilaxis como durante el tratamiento de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen pero sin limitación, prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquiera de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la tasa de avance de la enfermedad, mejora o paliativo del estado de enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para retrasar el avance de una enfermedad.

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

II. Producción de Anticuerpos Anti–BBB–R y sus Conjugados

Los métodos y artículos de manufactura de la presente invención usan o incorporan, un anticuerpo que se une al BBB–R. El antígeno de BBB–R usado para la producción de, o detección de anticuerpos puede ser, *por ejemplo,* una forma soluble o una porción de este (por ejemplo, el dominio extracelular), que contiene el epítope deseado. En forma alternativa o adicional, las células que expresan el BBB–R en su superficie celular se pueden usar para generar o detectar, anticuerpos. Otras formas de BBB–R útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica. Los ejemplos de BBB–R en la presente incluyen el receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor

del factor de crecimiento tipo insulina (IGF–R), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1) y LRP8 etc, y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF).

De acuerdo con la presente invención, un anticuerpo anti–BBB–R de "afinidad baja" (por ejemplo, anti–TfR) se selecciona sobre la base de los datos de la presente que demuestran que tales anticuerpos presentan mejor captación del SNC (por ejemplo, cerebro). A fin de identificar tales anticuerpos de afinidad baja, están disponibles varios ensayos para medir la afinidad del anticuerpo que incluyen, sin limitación: ensayo de Scatchard y la técnica de resonancia del plasmón superficial (por ejemplo, usando BIACORE®). De acuerdo con una forma de realización de la invención, el anticuerpo tiene una afinidad por el antígeno BBB–R (por ejemplo, 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. En consecuencia, la afinidad puede estar en el rango de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM, o en el rango de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 1 μM, o en el rango de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM, por ejemplo, medido por el análisis de Scatchard o BIACORE®.

En consecuencia, la invención proporciona un método de obtener un anticuerpo útil para transportar un fármaco para trastornos neurológicos a través de la barrera hematoencefálica que comprende seleccionar un anticuerpo de un panel de anticuerpos contra un receptor de la barrera hematoencefálica (BBB–R) ya que este tiene una afinidad por el BBB–R que está en el rango 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. En consecuencia, la afinidad puede estar en el rango de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM o en el rango de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 1 μM, o en el rango de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM, por ejemplo, medida por el análisis de Scatchard o BIACORE®. Como lo entenderá alguien con destreza ordinaria en el arte, conjugar una molécula heteróloga/compuesto a un anticuerpo disminuirá con frecuencia la afinidad del anticuerpo por su blanco debido, por ejemplo, a impedimento estérico o aun a eliminación de un brazo de unión si el anticuerpo se hace multiespecífico con uno o más brazos que se unen a un antígeno diferente que el blanco original del anticuerpo. En una forma de realización, un anticuerpo de baja afinidad del la invención, específico para TfR

conjugado a BACE1, tiene una Kd para TfR, medida por BIACORE, de aproximadamente 30 nM. En otra forma de realización, un anticuerpo de baja afinidad de la invención específica para TfR conjugado a BACE1 tiene una Kd para TfR, medida por BIACORE, de aproximadamente 600 nM.

Un ejemplo de ensayo para evaluar la afinidad del anticuerpo es por el análisis de Scatchard. Por ejemplo, el anticuerpo anti–BBB–R de interés se puede yodar por medio del método de lactoperoxidasa (Bennett y Horuk, *Methods in Enzymology* 288 pg.134–148 (1997)). Un anticuerpo anti–BBB–R radiomarcado se purifica de ^{125}I–Na libre por filtración en gel mediante una columna NAP–5 y se mide su actividad específica. Las mezclas de la reacción de competición de 50 μL que contienen una concentración fija de anticuerpo yodado y concentraciones decrecientes de anticuerpo no marcado diluido en forma seriada se colocan en las placas de 96 pocillos. Las células que expresan en forma transitoria el BBB–R se cultivan en medio de crecimiento, que consiste en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Genentech) suplementado con 10% de FBS, 2 mM de L–glutamina y 1 × penicilina–estreptomcina a 37°C en 5% de CO_2. Las células se desprenden de las placas por medio de la solución de disociación celular Sigma y se lavan con buffer de unión (DMEM con 1% de albúmina sérica bovina, 50 mM de HEPES, pH 7.2, y 0.2% de azida sódica). Las células lavadas se añaden a una densidad aproximada de 200,000 células en 0.2 mL de buffer de unión a las placas de 96 pocillos que contienen los 50 μL de las mezclas de la reacción de competición. La concentración final del anticuerpo no marcado en la reacción de competición con las células varía, comenzando en 1000 nM y luego se disminuye por dilución de 1:2 veces para 10 concentraciones y se incluye una muestra de solo buffer, con adición cero. Las reacciones de competición con las células para cada concentración de anticuerpo no marcado se ensayan por triplicado. Las reacciones de competición con las células se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 2 horas de incubación, las reacciones de competición se transfieren a una placa de filtro y se lavan cuatro veces con buffer de unión para separar el anticuerpo libre del yodado unido. Los filtros se cuentan con 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 ejemplo de análisis de scatchard utilizando las composiciones de la invención puede ser llevado a cabo como sigue. Anti-TFR^{A} fue yodado empleando

el método de lactoperoxidasa (Bennett y Horuk, *Methods in Enzymology* 288 pg.134–148 (1997)). Un anti-TFR^A radiomarcado fue purificado de ^{125}I-Na libre por filtración en gel mediante una columna NAP–5; el anti-TFR^A purificado tuvo una actividad específica de 19.82 μCi/μg. Las mezclas de la reacción de competición de 50 μL que contienen una concentración fija de anticuerpo yodado y concentraciones decrecientes de anticuerpo no marcado diluido en forma seriada se colocan en las placas de 96 pocillos. Las células 293 que expresan en forma transitoria TfR murino fueron cultivadas en medio de crecimiento, que consiste en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Genentech) suplementado con 10% de FBS, 2 mM de L–glutamina y 1 × penicilina–estreptomcina a 37°C en 5% de CO_2. Las células se desprenden de las placas por medio de la solución de disociación celular Sigma y se lavan con buffer de unión (DMEM con 1% de albúmina sérica bovina, 50 mM de HEPES, pH 7,2, y 0,2% de azida sódica). Las células lavadas se añaden a una densidad aproximada de 200.000 células en 0,2 mL de buffer de unión a las placas de 96 pocillos que contienen los 50 μL de las mezclas de la reacción de competición. La concentración final del anticuerpo yodado en cada reacción de competición con células fue 100 pM (134,000 cpm por 0.25 mL). La concentración final del anticuerpo no marcado en la reacción de competición con las células varía, comenzando en 1000 nM y luego se disminuye por dilución de 1:2 veces para 10 concentraciones y se incluye una muestra de solo buffer, con adición cero. Las reacciones de competición con las células para cada concentración de anticuerpo no marcado se ensayan por triplicado. Las reacciones de competición con las células se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 2 horas de incubación, las reacciones de competición se transfieren a una placa de filtro Millipore Multiscreen y se lavan cuatro veces con buffer de unión para separar el anticuerpo libre del yodado unido. Los filtros se cuentan con un contador gamma Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences; Waltham, MA). Los datos de unión se evalúan usando el software New Ligand (Genentech), que usa el algoritmo de ajuste de Munson y Rodbard (1980) para determinar la afinidad de unión del anticuerpo.

Un ejemplo de análisis BIACORE® empleando las composiciones de la invención puede ser llevado a cabo como sigue. Kd se mide usando los ensayos de resonancia del plasmón superficial con un dispositivo BIACORE®–2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C por medio del kit de Fc anti–humano (BiAcore Inc., Piscataway, NJ). En breves palabras, los chips 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 Fc anti–humano se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4.0, a 50 µg/ml antes de inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para obtener aproximadamente 10000 de unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del anticuerpo, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, las variantes del anticuerpo anti–TfR se inyectan en HBS–P para alcanzar aproximadamente 220 RU, luego se inyectan diluciones seriadas dos veces de MuTfR–His (0.61 nM a 157 nM) en HBS–P a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 30 µl/min. Las tasas de asociación (kon) y tasas de disociación (koff) se calcularon por medio de un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (Software de evaluación BIACORE® versión 3.2) por ajuste simultáneo de los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la razón de koff/kon. Ver, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865–881 (1999).

De acuerdo con otra forma de realización, Kd se mide usando los ensayos de resonancia del plasmón superficial con un dispositivo BIACORE®–2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C por medio del kit de Fc anti–humano (BiAcore Inc., Piscataway, NJ). En breves palabras, los chips 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 Fc anti–humano se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4.0, a 50 µg/ml antes de inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para obtener aproximadamente 10000 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del anticuerpo, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, las variantes del anticuerpo anti–BBB-R se inyectan en HBS–P para alcanzar aproximadamente 220 RU, luego se inyectan diluciones seriadas dos veces de BBB-R–His (0.61 nM a 157 nM) en HBS–P a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 30 µl/min. Las tasas de asociación (kon) y tasas de disociación (koff) se calcularon por medio de un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (Software de evaluación BIACORE® versión 3.2) por ajuste simultáneo de los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la

relación de koff/kon. Ver, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865–881 (1999).

Una medida sustituta para la afinidad de uno o más anticuerpos por el BBB-R es su concentración inhibitoria máxima media (IC50), una medida de cuánto del anticuerpo se necesita para inhibir la unión de un ligando BBB-R conocido al BBB-R en 50%. Varios métodos para determinar el IC50 para un compuesto dado son conocidos en la técnica; un enfoque común es llevar a cabo un ensayo de unión competitivo, tal como el descrito en la presente en los ejemplos, es decir, con respecto a la Figura 2A. En general, un IC50 alto indica que se requiere más anticuerpo para inhibir la unión del ligando conocido, y de esta manera que la afinidad del anticuerpo por ese ligando es relativamente baja. A la inversa, un IC50 bajo indica que se requiere menos anticuerpo para inhibir la unión del ligando conocido, y de esta manera que la afinidad del anticuerpo por ese ligando es relativamente alta.

Un ejemplo de ensayo ELISA competitivo para medir IC50 es uno en el cual concentraciones crecientes de variantes de anticuerpos anti-TfR o anti-TfR/antígeno cerebral (es decir, anti-TfR/BACE1, anti-TfR/Abeta y similares) se usan para competir contra TfR^A biotinilado por unión a TfR. La competición ELISA anti-TfR se lleva a cabo en placas Maxisorp (Neptune, N.J.) recubiertas con 2.5 µg/ml de dominio extracelular TfR murino purificado a 4°C durante la noche. Las placas se lavan con PBS/Tween 20 0.05% y se bloquean utilizando buffer de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Una titulación de cada anti-TfR o anti-TfR antígeno cerebral individual (es decir, anti-TfR/BACE1 o anti-TfR/Abeta) (dilución serial 1:3) se combina con anti-TfR^A biotinilado (concentración final 0.5 nM) y se añade a la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan con PBS/Tween 20 0.05% y se añade HRP-estreptavidina (Southern Biotech, Birmingham) a la placa y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan con PBS/Tween 20 0.05%, y el anti-TfR^A biotinilado unido a la placa se detecta usando substrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

En una forma de realización, el anticuerpo anti–BBB–R de baja afinidad de la presente se acopla con una marca y/o fármaco para trastornos neurológicos o agente de imagen a fin de transportar más eficientemente la marca y/o fármaco a través de la BBB. Tal acoplamiento se puede obtener por agentes de reticulado químico o por la generación de proteínas de fusión, etc.

La conjugación covalente puede ser directa o por medio de un ligador. En ciertas formas de realización, la conjugación directa es por la construcción de una fusión de proteína (es decir, por fusión genética de los dos genes que codifican el anticuerpo BBB–R y fármaco para trastornos neurológicos y expresión como una proteína simple). En ciertas formas de realización, la conjugación directa es por la formación de un enlace covalente entre un grupo reactivo sobre una de las dos porciones del anticuerpo anti–BBB–R y un grupo correspondiente o aceptor sobre el fármaco neurológico. En ciertas formas de realización, la conjugación directa es por la modificación (es decir, modificación genética) de una de las dos moléculas por conjugar para incluir un grupo reactivo (como ejemplos no limitantes, un grupo sulfhidrilo o un grupo carboxilo) que forma una unión covalente a la otra molécula por conjugar en condiciones apropiadas. Como ejemplo no limitante, una molécula (es decir, un aminoácido) con un grupo reactivo deseado (es decir, un residuo de cisteína) se puede introducir, por ejemplo, en el anticuerpo anti–BBB–R y un enlace disulfuro formado con el fármaco neurológico. Los métodos para la conjugación covalente de los ácidos nucleicos a las proteínas también son conocidas en la técnica (es decir, fotorreticulación, ver, por ejemplo, Zatsepin et al. *Russ. Chem.* Rev. 74: 77–95 (2005)). La conjugación no covalente puede ser por cualquier medio de unión no covalente, incluyendo enlaces hidrofóbicos, enlaces iónicos, interacciones electrostáticas, y similares, tal como será entendido fácilmente por los expertos en la técnica. La conjugación también se puede realizar usando una variedad de ligadores. Por ejemplo, un anticuerpo anti–BBB–R y un fármaco neurológico se pueden conjugar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional 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 HCl de dimetilo), 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–activo (tales como 1,5–difluoro–2,4–dinitrobenceno). También se pueden usar ligadores de péptidos, compuestos de uno a veinte aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En ciertas formas de realización, los aminoácidos se seleccionan de los veinte aminoácidos naturales. En ciertas otras formas de realización, los aminoácidos se seleccionan de los veinte aminoácidos que ocurren naturalmente. En ciertas otras

formas de realización, uno o más de los aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco neurológico después de la administración en el cerebro. Por ejemplo, se puede usar un ligador lábil al ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127–131 (1992); Patente de los Estados Unidos 5.208.020).

La invención en la presente contempla expresamente, pero sin limitación, conjugados preparados con reactivos de reticulación que incluyen, pero sin limitación, 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 en el comercio (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

Para un trastorno neuropático, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un analgésico que incluye, pero sin limitación, un analgésico narcótico/opioide (es decir, morfina, fentanilo, hidrocodona, meperidina, metadona, oximorfona, pentazocina, propoxifeno, tramadol, codeína y oxicodona), un fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAID) (es decir, ibuprofeno, naproxeno, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketorolac, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, oxaprozina, piroxicam, sulindac, y tolmetina), un corticoide (es decir, cortisona, prednisona, prednisolona, dexametasona, metilprednisolona y triamcinolona), un agente anti–migraña (es decir, sumatriptina, almotriptano, frovatriptano, sumatriptano, rizatriptano, eletriptano, zolmitriptano, dihidroergotamina, eletriptano y ergotamina), acetaminofeno, un salicilato (es decir, aspirina, salicilato de colina, salicilato de magnesio, diflunisal, y salsalato), un anticonvulsivante (es decir, carbamazepina, clonazepam, gabapentina, lamotrigina, pregabalina, tiagabina, y topiramato), un anestésico (es decir, isoflurano, tricloroetileno, halotano, sevoflurano, benzocaína, cloroprocaína, cocaína, ciclometicaína, dimetocaína, propoxicaína, procaína, novocaína, proparacaína, tetracaína, articaína, bupivacaína, carticaína, cinchocaína, 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 que involucra vértigo, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente anti–vertiginoso que incluye, pero sin limitación, meclizina, difenhidramina,

prometazina y diazepam. Para un trastorno neuropático que involucra náuseas, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente anti–náuseas que incluye, pero sin limitación, prometazina, clorpromazina, proclorperazina, trimetobenzamida, y metoclopramida. Para una enfermedad neurodegenerativa, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un factor de hormona de crecimiento o neurotrófico; los ejemplos incluyen pero sin limitación factor neurotrófico derivado de 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 interleuquina 1 (IL–1ra), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado glial (GDNF), neurturina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), herregulina, neurregulina, artemina, persefina, interleuquinas, factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GFR), factor estimulante de colonia de granulocitos (CSF), granulocito–macrófago–CSF, netrinas, cardiotrofina–1, erizos, factor inhibidor de leucemia (LIF), midkina, pleiotrofina, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), netrinas, saposinas, semaforinas, y factor de célula madre (SCF).

Para cáncer, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CITOXAN® ciclosfosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosformamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (en especial bulatacina y bulatacinona); delta–9–tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta–lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluyen el análogo sintético de topotecano (HYCAMTIN®), CPT–11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9–aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC–1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilílico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW–2189 y CB1–TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictíina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida,

mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tal como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimnustina; antibióticos tal como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma1I y calicheamicina omega1 (ver, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183–186 (1994)); dinemicina, que incluyen dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de cromoproteína de enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6–diazo–5–oxo–L–norleucina, ADRIAMICINA® doxorrubicina (que incluyen morfolino–doxorrubicina, cianomorfolino–doxorrubicina, 2–pirrolino–doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti–metabolitos tales como metotrexato y 5–fluorouracilo (5–FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6–mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6–azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti–adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maytansinoides tales como maytansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2–etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''–triclorotrietilamina; tricotecenos (en especial toxina T–2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida ("Ara–C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo,

TAXOL® paclitaxel (Bristol–Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM Cremofor–libre, formulación de nanopartículas manipulada genéticamente en la albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône–Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; 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 topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquier de los anteriores; así como las combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado 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 las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y a menudo en la forma de tratamiento sistémico o de cuerpo entero. Estas pueden ser las hormonas mismas. Los ejemplos incluyen anti–estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (que incluyen NOLVADEX® tamoxifeno), EVISTA® raloxifeno, droloxifeno, 4–hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® torremifeno; anti–progesteronas; reguladores por disminución del receptor de estrógeno (ERDs); agentes que actúan para suprimir o anular los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tal como LUPRON® y ELIGARD® acetato de leuprolida, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros anti–andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tal como, por ejemplo, 4(5)–imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestano, formestano, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, y ARIMIDEX® anastrozol. Además, tal definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), DIDROCAL® etidronato,

NE–58095, ZOMETA® ácido zoledrónico/zoledronato, FOSAMAX® alendronato, AREDIA® pamidronato, SKELID® tiludronato, o ACTONEL® risedronato; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de citosina 1,3–dioxolano); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de los genes de las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tal como, por ejemplo, PKC–alfa, Raf, H–Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF–R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; LURTOTECAN® inhibidor de topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de tirosina quinasa dual de ErbB–2 y EGFR también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Otro grupo de compuestos que se pueden seleccionar como fármacos neurológicos para el tratamiento o prevención del cáncer son inmunoglobulinas anticáncer (que incluyen, pero sin limitación, trastuzumab, bevacizumab, alemtuxumab, cetuximab, gemtuzumab ozogamicina, ibritumomab tiuxetan, panitumumab y rituximab). En algunos casos, se pueden usar anticuerpos en conjunto con una marca tóxica para dirigirse y destruir las células deseadas (es decir, células de cáncer), que incluyen, pero sin limitación, tositumomab con una radiomarca ^{131}I.

Para una enfermedad o trastorno ocular, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente oftálmico anti–angiogénico (es decir, bevacizumab, ranibizumab y pegaptanib), un agente oftálmico para glaucoma (es decir, carbachol, 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), una antihistamina oftálmica (es decir, nafazolina, fenilefrina y tetrahidrozolina), un lubricante ocular, un esteroide oftálmico (es decir, fluorometolona, prednisolona, loteprednol, dexametasona, difluprednato, rimexolona, fluocinolona, medrisona y triamcinolona), un anestésico oftálmico (es decir, lidocaína, proparacaína y tetracaína), un anti–infeccioso oftálmico (es decir, levofloxacina, gatifloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina, cloramfenicol, 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, nepafenac, ketorolac, flurbiprofeno, suprofeno, ciclosporina, triamcinolona, diclofenac y bromfenac), y una antihistamina o descongestivo oftálmico (es decir, ketotifeno, olopatadina, epinastina, nafazolina, cromolina, tetrahidrozolina, pemirolast, bepotastina, nafazolina, fenilefrina, nedocromilo, lodoxamida, fenilefrina, emedastina y azelastina).

Para un trastorno de convulsiones, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un anticonvulsivante o antiepiléptico que incluyen, pero sin limitación, anticonvulsivantes de barbiturato (es decir, primidona, metharbital, mefobarbital, alobarbital, amobarbital, aprobarbital, alfenal, barbital, bralobarbital y fenobarbital), anticonvulsivantes de benzodiacepinas (es decir, diazepam, clonazepam, y lorazepam), anticonvulsivantes carbamato (es decir felbamate), anticonvulsivantes de inhibidor de anhidrasa carbónica (es decir, acetazolamida, topiramato y zonisamida), anticonvulsivantes de dibenzazepina (es decir, rufinamida, carbamacepina, y oxcarbacepina), anticonvulsivantes derivados de ácidos grasos (es decir, divalproex y ácido valproico), análogos de ácido gamma–aminobutírico (es decir, pregabalina, gabapentina y vigabatrina), inhibidores de la recaptación de ácido gamma–aminobutírico (es decir, tiagabina), inhibidores de la transaminasa de ácido gamma–aminobutírico (es decir, vigabatrina), anticonvulsivantes de hidantoína (es decir fenitoína, etotoína, fosfenitoína y mefenitoína), anticonvulsivantes misceláneos (es decir, lacosamida y sulfato de magnesio), progestinas (es decir, progesterona), anticonvulsivantes de oxazolidinodiona (es decir, parametadiona y trimetadiona), anticonvulsivantes de pirrolidina (es decir, levetiracetam), anticonvulsivantes de succinimida (es decir, etosuximida y metsuximida), anticonvulsivantes de triazina (es decir, lamotrigina), y anticonvulsivantes de urea (es decir, fenacemida y feneturida).

Para una enfermedad del almacenamiento lisosómico, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es por sí mismo o imita de otro modo la actividad de la enzima que está alterada en la enfermedad. Los ejemplos de enzimas recombinantes para el tratamiento de trastornos del almacenamiento lisosómico incluyen, pero sin limitación, las que se exponen por ejemplo en, publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos publicación Nº 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, alfa–glucosidasa ácida, glucocerebrosidasa, alfa–galactosidasa A, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida, beta–

galactocerebrosidasa, beta–galactosidasa, arilsulfatasa A, ceramidasa ácida, aspartoacilasa, palmitoil–protein tioesterasa 1 y tripeptidil amino peptidasa 1).

Para la amiloidosis, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluye, pero sin limitación, un anticuerpo u otra molécula de unión (que incluye, pero sin limitación una molécula pequeña, un péptido, un aptámero, u otro agente de unión a proteína) que se une específicamente a un blanco seleccionado de: beta secretasa, tau, presenilina, proteína precursora del amiloide o porciones de estas, péptido beta amiloide u oligómeros o fibrillas de este, receptor de muerte 6 (DR6), receptor para productos finales avanzados de glicación (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 de antiparkinsonismo anticolinérgico (es decir, prociclidina, difenhidramina, trihexilfenidilo, benztropina, biperideno y trihexifenidilo); un agente de antiparkinsonismo dopaminérgico (es decir, entacapona, selegilina, pramipexol, bromocriptina, rotigotina, selegilina, ropinirol, rasagilina, apomorfina, carbidopa, levodopa, pergolida, tolcapona y amantadina); una tetrabenazina; un antiinflamatorio (que incluye, pero sin limitación, un fármaco antiinflamatorio no esteroide (es decir, indometacina y otros compuestos listados anteriormente); una hormona (es decir, estrógeno, progesterona y leuprolida); una vitamina (es decir, folato y nicotinamida); una dimebolina; una homotaurina (es decir, ácido 3–aminopropanosulfónico; 3APS); un modulador de la actividad del receptor de serotonina (es decir, xaliprodeno); un interferón y un glucocorticoide.

Para una enfermedad viral o microbiana, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluye, pero sin limitación, un compuesto antiviral (que incluye, pero sin limitación, un antiviral de adamantano (es decir, rimantadina y amantadina), un antiviral de interferón (es decir, peginterferón alfa–2b), un antagonista del receptor de quimioquina (es decir, maraviroc), un inhibidor de transferencia de la cadena de integrasa (es decir, raltegravir), un inhibidor de neuraminidasa (es decir, oseltamivir y zanamivir), un inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídica (es decir, efavirenz, etravirina, delavirdina y nevirapina), un inhibidor de transcriptasa inversa nucleosídica (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 antiviral misceláneo (es decir, enfuvirtida, foscarnet, palivizumab y fomivirsen)), un antibiótico (que incluyen, pero sin limitación, una aminopenicilina (es decir, amoxicilina, ampicilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucoxacilina, temocilina, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina y bacampicilina), una cefalosporina (es decir, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefamandol, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, cefadroxilo, cefradina, loracarbef, cefotetan, cefuroxima, cefprozilo, cefaclor, y cefoxitina), un carbapenem/penem (es decir, imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem y doripenem), un monobactam (es decir, aztreonam, tigemonam, norcardicina A y tabtoxinina–beta–lactama, un inhibidor de beta–lactamasa (es decir, ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam) en conjunto con otro antiibiótico beta–lactama, un aminoglucósido (es decir, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomicina, tobramicina, y paromomicina), una ansamicina (es decir, geldanamicina y herbimicina), un carbacefem (es decir, loracarbef), un glicopéptido (es decir, teicoplanina y vancomicina), un macrólido (es decir, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espectinomicina), un monobactam (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, sulfonamidocrisoidina, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprima, trimetoprima y sulfametoxazol), una tetraciclina (es decir, tetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina y oxitetraciclina), un antibiótico antineoplásico o citotóxico (es decir, doxorrubicina, mitoxantrona, bleomicina, daunorrubicina, dactinomicina, epirrubicina, idarrubicina, plicamicina, mitomicina, pentostatina y valrubicina) y un compuesto antibacteriano misceláneo (es decir, bacitracina, colistina y polimixina B)), un antifúngico (es decir, metronidazol, nitazoxanida, tinidazol, cloroquina, iodoquinol y paromomicina), y un antiparasitario (que incluyen, pero sin limitación, quinina, cloroquina, amodiaquina, pirimetamina, sulfadoxina, proguanilo, mefloquina, atovaquona, primaquina, artemesinina, halofantrina, doxiciclina, clindamicina, mebendazol, pirantel pamoato, tiabendazol, dietilcarbamazina, ivermectina, rifampina, amfotericina B, melarsoprol, efornitina y albendazol).

Para la isquemia, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluye, pero sin limitación, un trombolítico (es decir, uroquinasa, alteplasa, reteplasa y

tenecteplasa), un inhibidor de la agregación plaquetaria (es decir, aspirina, cilostazol, clopidogrel, prasugrel y dipiridamol), una estatina (es decir, lovastatina, pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina, atorvastatina, simvastatina, cerivastatina y pitavastatina), y un compuesto para aumentar el flujo sanguíneo o la flexibilidad vascular, que incluye, por ejemplo, las medicaciones para la presión arterial.

Para un trastorno de conducta, un fármaco neurológico se puede seleccionar de un compuesto modificador de la conducta que incluye, pero sin limitación, 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 misceláneo (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 monoamino oxidasa (es decir, isocarboxazida, fenelzina, selegilina y tranilcipromina), una benzodiacepina (es decir, alprazolam, estazolam, flurazeptam, clonazepam, lorazepam y diazepam), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina–dopamina (es decir, bupropion), un estimulante del SNC (es decir, fentermina, dietilpropion, metanfetamina, dextroanfetamina, anfetamina, metilfenidato, dexmetilfenidato, lisdexanfetamina, modafinilo, pemolina, fendimetrazina, benzfetamina, fendimetrazina, armodafinilo, dietilpropion, cafeína, atomoxetina, doxapram, y mazindol), un ansiolítico/sedante/hipnótico (que incluye, pero sin limitación, un barbiturato (es decir, secobarbital, fenobarbital y mefobarbital), una benzodiacepina (como se describió anteriormente), y un ansiolítico/sedante/hipnótico misceláneo (es decir difenhidramina, oxibato de sodio, zaleplon, hidroxizina, hidrato de cloral, aolpidem, buspirona, doxepina, eszopiclona, ramelteon, meprobamato y etclorvinol)), una secretina (ver, por ejemplo, Ratliff–Schaub et al. *Autism* 9: 256–265 (2005)), un péptido opioide (ver, por ejemplo, Cowen et al., *J. Neurochem.* 89:273–285 (2004)), y un neuropéptido (ver, por ejemplo, Hethwa et al. *Am. J. Fysiol.* 289: E301–305 (2005)).

Para la inflamación del SNC, se puede seleccionar un fármaco neurológico que se dirija a la inflamación misma (es decir, un agente antiinflamatorio no esteroide tal como ibuprofeno o naproxeno), o uno que trate la causa subyacente de la inflamación (es decir, un agente antiviral o anticáncer).

De acuerdo con una forma de realización de la invención, el "acoplamiento" se obtiene por la generación de 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 una forma de realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión con el antígeno que une el BBB–R y un segundo sitio de unión con el antígeno que une un antígeno cerebral, tal como beta–secretasa 1 (BACE1) o Abeta, y los otros antígenos cerebrales descriptos en la presente.

Un ejemplo de antígeno cerebral unido por tal anticuerpo multiespecífico/ biespecífico es BACE1, y un ejemplo de anticuerpo que se une a este es el anticuerpo YW412.8.31 de las Fig. 5A–B de la presente.

En otra forma de realización, el antígeno cerebral es Abeta, los ejemplos de tales anticuerpos se describen en WO2007068412, WO2008011348, WO20080156622, y WO2008156621, expresamente incorporados en la presente a modo de referencia, con un ejemplo de anticuerpo Abeta que comprende anticuerpo MABT5102A IgG4 que comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y liviana de las Fig. 7A y 7B, respectivamente.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada–cadena liviana de la inmunoglobulina que tienen especificidades diferentes (ver Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), WO 93/08829, y Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), e ingeniería "botón en ojal" (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nº 5.731.168). También pueden prepararse anticuerpos multiespecíficos mediante manipulación de efectos de direccionamiento electrostático a fin de generar moléculas de anticuerpo de Fc heterodimérico (WO 2009/089004A1); reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nº 4.676.980, y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); usando cierres de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547–1553 (1992)); usando tecnología "diacuerpo" para obtener fragmentos de anticuerpo biespecífico (ver, por ejemplo, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444–6448 (1993)); y usando dímeros de Fv de cadena simple (sFv) (ver, por

ejemplo, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describió, por ejemplo, en Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos manipulados genéticamente con tres o más sitios de unión con el antígeno funcionales, que incluyen "anticuerpos Octopus" o "inmunoglobulinas de dominio variable dual" (DVD) también se incluyen en la presente (ver, por ejemplo, US 2006/0025576A1, y Wu et al. *Nature Biotechnology* (2007)).

El anticuerpo o fragmento de la presente también incluye un "FAb de acción dual" o "DAF" que comprende un sitio de unión con el antígeno que se une al BBB–R (por ejemplo, TfR) así como el antígeno cerebral (por ejemplo, BACE1) (ver, US 2008/0069820, por ejemplo).

En una forma de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, varios de estos fragmentos se describieron anteriormente.

En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo intacto o de longitud completa. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a clases diferentes. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de estos se pueden dividir adicionalmente en cinco subclases (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. En una forma de realización, el anticuerpo intacto carece de función efectora.

Las técnicas para generar anticuerpos son conocidas y los ejemplos se han proporcionado anteriormente en la sección de las definiciones de este documento. En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o su fragmento de unión al antígeno.

Varias técnicas están disponibles para determinar la unión del anticuerpo al BBB–R. Una de estas es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para confirmar una capacidad para unir el BBB–R humano (y antígeno cerebral). De acuerdo con este ensayo, las placas recubiertas con antígeno (por ejemplo, sBBB–R recombinante) se incuban con una muestra que comprende el

anticuerpo anti–BBB–R y se determina la unión del anticuerpo al antígeno de interés.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se analiza para determinar su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, por métodos conocidos tales como ELISA, transferencia Western, etc.

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

A continuación se describirán los ejemplos de ensayos donde el anticuerpo multiespecífico se une a BACE1.

Los ensayos de competición se pueden usar para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos o Fab descriptos en la presente, 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 ciertas formas de realización, tal anticuerpo de competición se une al mismo epítope (por ejemplo, un epítope lineal o conformacional) que se une con cualquiera de los anticuerpos o Fab descriptos en la presente, por ejemplo, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10. Los ejemplos de métodos detallados para mapear un epítope al cual se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ejemplo de ensayo de competición, el 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 analiza para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión a BACE1. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante del hibridoma. Como control, el BACE1 inmovilizado se incuba 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 elimina el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marca asociada con BACE1 inmovilizado. Si la cantidad de marca asociada con BACE1 inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo con respecto a la muestra control, entonces esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión

para BACE1. Ver Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

En un aspecto, los ensayos se proporcionan para identificar los anticuerpos anti–BACE1 de este que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la inhibición de la actividad de aspartil proteasa de BACE. También se proporcionan los anticuerpos que tienen tal actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*, por ejemplo, evaluado por el ensayo HRTF de fluorescencia resuelto por tiempo homogéneo o un ensayo electroforético capilar microfluídico (MCE) usando péptidos de sustrato sintético, o *in vivo* en las líneas celulares que expresan los sustratos de BACE1 tales como APP.

El anticuerpo (incluyendo el anticuerpo multiespecífico) en la presente opcionalmente se produce en forma recombinante en una célula huésped transformada con secuencias de ácidos nucleicos que codifican sus cadenas pesada y liviana (por ejemplo, donde la célula huésped se ha transformado con uno o más vectores con el ácido nucleico de la presente). 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 el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con opcionales portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de las formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen buffer tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tal como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos tal como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3–pentanol; y m–cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA;

azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (*por ejemplo,* complejos de Zn–proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación en la presente también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario, opcionalmente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. El tipo y las cantidades efectivas de tales medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad del anticuerpo presente en la formulación, y parámetros clínicos de los sujetos. Los ejemplos de tales medicamentos se describen a continuación.

Los ingredientes activos también se encapsulan en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli–(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th 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 hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, tales matrices están en forma de artículos moldeados, *por ejemplo,* películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2–hidroxietil–metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilácticos (Pat. de los Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L–glutámico y γ etil–L–glutamato, etileno–acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico–ácido glicólico degradable tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico–ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli–D–(–)–3–hidroxibutírico.

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

En una forma de realización la formulación es isotónica.

IV. Usos terapéuticos de los anticuerpos anti–BBB–R

Los anticuerpos anti–BBB–R (que incluyen anticuerpos multiespecíficos que los comprenden) se pueden utilizar en una variedad de métodos *in vivo*. Por ejemplo, la invención proporciona un método de transportar un compuesto terapéutico a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer el anticuerpo anti–BBB–R acoplado a un compuesto terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que une el BBB–R y un antígeno cerebral) a la BBB de modo que el anticuerpo transporta el compuesto terapéutico acoplado al mismo a través de la BBB. En otro ejemplo, la invención proporciona un método de transportar un fármaco para trastornos neurológicos a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer el anticuerpo anti-BBB acoplado a un fármaco para trastorno cerebral (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que se une a BBB-R y a un antígeno cerebral) a la BBB de modo que el anticuerpo transporta el fármaco para trastornos neurológicos acoplado al mismo a través de la BBB. En una forma de realización, la presente BBB está en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), por ejemplo, uno que tiene un trastorno neurológico, que incluye, sin limitación: enfermedad de Alzheimer (EA), accidente cerebrovascular, 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.

En una forma de realización, el trastorno neurológico se selecciona de: una neuropatía, amiloidosis, cáncer (por ejemplo, que involucra el SNC o cerebro), una enfermedad o trastorno ocular, una infección viral o microbiana, inflamación (por ejemplo, del SNC o cerebro), isquemia, enfermedad neurodegenerativa, convulsiones, trastorno de conducta, enfermedad del almacenamiento lisosómico, etc.

Los trastornos neuropáticos son enfermedades o anormalidades del sistema nervioso caracterizados por señalización nerviosa inapropiada o descontrolada o su carencia, e incluyen, pero sin limitación, dolor crónico (que incluye, dolor nociceptivo), dolor causado por una lesión a los tejidos corporales, que incluye dolor relacionado con cáncer, dolor neuropático (dolor causado por anormalidades en los nervios, médula espinal, o cerebro), y dolor psicogénico (completamente o en su mayor parte relacionado con un trastorno psicológico), cefalea, migraña, neuropatía, y síntomas y síndromes que a menudo acompañan tales trastornos neuropáticos como vértigo o náuseas.

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades y trastornos asociadas con depósitos proteináceos extracelulares en el SNC, que incluyen, pero sin limitación, amiloidosis secundaria, amiloidosis relacionada con la edad, enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve (DCL), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo de Parkinson–Demencia de Guam, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiforme transmisible, demencia relacionada con VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), y enfermedades oculares relacionadas con el depósito beta–amiloide (es decir, degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusen y catarata).

Los cánceres del SNC se caracterizan por la proliferación aberrante de una o más células del SNC (es decir, una célula neural) e incluye, pero sin limitación, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, astrocitoma, neuroma acústico, condroma, oligodendroglioma, meduloblastomas, ganglioglioma, Schwannoma, neurofibroma, neuroblastoma, y tumores extradural, intramedular o intradural.

Las enfermedades o trastornos oculares son enfermedades o trastornos del ojo, que para los fines de la presente se considera un órgano del SNC sujeto a la BBB. Las enfermedades o trastornos oculares incluyen, pero sin limitación, trastornos de la esclera, córnea, iris y cuerpo ciliar (es decir, escleritis, queratitis, úlcera corneana, abrasión corneana, ceguera por nieve, ceguera temporal, queratopatía punteada superficial de Thygeson, neovascularización corneana, distrofia de Fuchs, queratocono, queratoconjuntivitis seca, iritis y uveítis), trastornos del cristalino (es decir, catarata), trastornos de coroide y retina (es decir, desprendimiento de retina, retinosquisis, retinopatía hipertensiva, retinopatía diabética, retinopatía, retinopatía de prematuros, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular (húmeda y seca), membrana epirretiniana, retinitis pigmentosa y edema macular), glaucoma, manchas flotantes, trastornos del nervio óptico y vías visuales (es decir, neuropatía hereditaria de Leber y drusen del disco óptico), trastornos de músculos oculares/acomodación del movimiento binocular/refracción (es decir, estrabismos, oftalmoparesis, oftalmplejía externa progresiva, esotropía, exotropía, hipermetropía, miopía, astigmatismo, anisometropía, presbiopía y oftalmoplejía), disturbios visuales y ceguera (es decir, ambliopía, amaurosis congénita de Lever, escotoma, ceguera al color, acromatopsia, nictalopía, ceguera, ceguera del río y micro–

oftalmía/coloboma), ojo rojo, pupilas de Argill Robertson, queratomicosis, xeroftalmía y aniridia.

Las infecciones virales o microbianas del SNC incluyen, pero sin limitación, infecciones por virus (es decir, influenza, HIV, poliovirus, rubéola), bacteria (es decir, Neisseria sp., Streptococcus sp., Pseudomonas sp., Proteus sp., E. coli, S. aureus, Pneumococcus sp., Meningococcus sp., Haemofilus sp., y Mycobacterium tuberculosis) y otros microorganismos tales como hongos (es decir, levaduras, Criptococcus neoformans), parásitos (es decir, toxoplasma gondii) o amebas que producen fisiopatologías del SNC que incluyen, pero sin limitación, meningitis, encefalitis, mielitis, vasculitis y absceso, que pueden ser agudas o crónicas.

La inflamación del SNC es la inflamación que es causada por una lesión en el SNC, que puede ser una lesión física (es decir, debido a accidente, cirugía, trauma cerebral, lesión de la médula espinal, concusión) o una lesión debida o relacionada a una o más enfermedades o trastornos diversos del SNC (es decir, absceso, cáncer, infección viral o microbiana).

La isquemia del SNC, como se usa en la presente, se refiere a un grupo de trastornos relacionados con el flujo sanguíneo o comportamiento vascular aberrante en el cerebro o las causas de estos, e incluye, pero sin limitación: isquemia focal cerebral, isquemia cerebral global, accidente cerebrovascular (es decir, hemorragia subaracnoide y hemorragia intracerebral), y aneurisma.

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con pérdida de células neurales de función o muerte en el SNC, e incluyen, pero sin limitación: 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 con una amiloidosis, ataxia de Friedreich, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Kennedy, atrofia multisistémica, esclerosis múltiple, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, atrofia muscular espinal, mielitis transversa, enfermedad de Refsum, y ataxia espinocerebelar.

Las enfermedades y trastornos con convulsiones del SNC involucran una conducción eléctrica inapropiada y/o anormal del SNC, e incluyen, pero sin limitación: epilepsia (es decir, convulsiones de ausencia, convulsiones atónicas, epilepsia rolándica benigna, ausencia en 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 de Otahara, síndrome de West, convulsiones mioclónica, trastornos mitocondriales, epilepsias mioclónicas progresivas, convulsiones psicogénicas, 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, estatus epilépticos, epilepsia abdominal, convulsiones akinéticas, convulsiones autonómicas, mioclono bilateral masivo, epilepsia catamenial, convulsiones con caídas, convulsiones emocionales, convulsiones focales, convulsiones gelásticas, marcha Jacksoniana, enfermedad de Lafora, convulsiones motoras, convulsiones multifocales, convulsiones nocturnas, convulsiones fotosensibles, pseudoconvulsiones, convulsiones sensoriales, convulsiones sutiles, convulsiones de Sylvan, convulsiones de abstinencia, y convulsiones reflejas visuales).

Los trastornos de conducta son trastornos del SNC caracterizados por la conducta aberrante por parte del sujeto afectado e incluyen, pero sin limitación: trastornos del sueño (es decir, insomnio, parasomnias, 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 de hiperactividad por déficit de atención (ADHD), trastorno por déficit de atención (ADD), síndrome de fatiga crónica, agorafobia, trastorno por estrés postraumático, trastorno bipolar), trastornos alimentarios (es decir, anorexia o bulimia), psicosis, trastornos de conducta del desarrollo (es decir, autismo, síndrome de Rett, síndrome de Aspberger), trastornos de personalidad y trastornos psicóticos (es decir, esquizofrenia, trastorno delirante, y similares).

Los trastornos del almacenamiento lisosómico son trastornos metabólicos que están en algunos casos asociados con el SNC o tienen síntomas específicos del SNC; tales trastornos incluyen, pero sin limitación: enfermedad de Tay–Sachs, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, mucopolisacaridosis (tipos I, II, III, IV, V, VI y VII), enfermedad del almacenamiento de glucógeno, GM1–gangliosidosis, leucodristrofia metacromática, enfermedad de Farber, leucodistrofia de Canavan y liposfuscinosis ceroide neuronal tipos 1 y 2, enfermedad de Niemann–Pick, enfermedad de Pompe, y enfermedad de Krabbe.

En un aspecto, el anticuerpo se usa para detectar un trastorno neurológico antes del inicio de los síntomas y/o para evaluar la severidad o duración de la enfermedad o trastorno. En un aspecto, el anticuerpo permite la detección y/o el examen por imágenes del trastorno neurológico, que incluyen examen de imágenes por radiografía, tomografía, o imagen de resonancia magnética (MRI).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo de afinidad baja anti–BBB–R para usar como un medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo de afinidad baja anti–BBB–R para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). En ciertas formas de realización, se proporciona un anticuerpo de afinidad baja anti–BBB–R para usar en un método de tratamiento. En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo de afinidad baja anti–BBB–R para usar en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva del anticuerpo anti–BBB–R (opcionalmente acoplado a un fármaco para trastornos neurológicos). En tal forma de realización, el método además comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional. En otras formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti–BBB–R para usar en la reducción o inhibición de la formación de la placa amiloide en un paciente con riesgo o que padece de una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las anteriores formas de realización es opcionalmente un ser humano. En cierto aspecto, el anticuerpo anti–BBB–R para usar en los métodos de la invención aumenta la captación del fármaco para trastornos neurológicos con el que se acopla.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de afinidad baja anti–BBB–R en la fabricación o preparación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de la enfermedad o trastorno neurológico. En una forma de realización adicional, el medicamento es para usar en un método de tratamiento de la enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar a un individuo que padece la enfermedad o trastorno neurológico una cantidad efectiva del medicamento. En tal forma de realización, el método también comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer. En una forma de realización, el método comprende

administrar a un individuo que padece la enfermedad de Alzheimer una cantidad efectiva de un anticuerpo multiespecífico que se une a BACE1 y TfR. En tal forma de realización, el método también comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede ser un ser humano.

Los anticuerpos anti–BBB–R de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, el anticuerpo anti–BBB–R de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En ciertas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un agente terapéutico efectivo para tratar el mismo o diferente trastorno neurológico que el anticuerpo anti–BBB–R que se está empleando para el tratamiento. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero sin limitación: los diversos fármacos neurológicos descriptos anteriormente, inhibidores de colinesterasa (tal como donepezilo, galantamina, rovastigmina, y tacrina), antagonistas del receptor de NMDA (tal como memantina), inhibidores de agreagación del péptido amiloide beta, antioxidantes, moduladores de γ–secretasa, mímicos del factor de crecimiento nervioso (NGF) o terapia génica de NGF, agonistas de PPARγ, inhibidores de HMS–CoA reductasa (estatinas), ampakinas, bloqueadores del canal de calcio, antagonistas del receptor de GABA, inhibidores de glucógeno sintasa quinasa, inmunoglobulina intravenosa, agonistas del receptor muscarínico, moduladores del receptor nicrotínico, inmunización activa o pasiva del péptido amiloide beta, inhibidores de fosfodiesterasa, antagonistas del receptor de serotonina y anticuerpos anti–péptido amiloide beta. En ciertas formas de realización, el al menos un agente terapéutico adicional se selecciona por su capacidad para mitigar uno o más efectos secundarios del fármaco neurológico.

Tales terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las formulaciones iguales o separadas), y administración separada, en tal caso, la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir antes de, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en combinación con otras terapias intervencionales tales como, pero sin limitación, terapia de radiación, terapia de comportamiento, u otras terapias conocidas en la técnica y apropiadas para el trastorno neurológico por tratar o prevenir.

El anticuerpo anti–BBB–R de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tal como inyecciones intravenosas o subcutáneas, que dependen en parte de si la administración es breve o crónica. Varios esquemas de dosis que incluyen pero sin limitación administraciones únicas o múltiples para varios puntos de tiempo, administración en bolo, e infusión por pulsos están contemplados en la presente.

Los métodos basados en lípidos de transportar el anticuerpo o fragmento de este a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, encapsulado del anticuerpo o fragmento de este en liposomas que se acoplan a los fragmentos de unión del anticuerpo que se unen a los receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (ver, *por ejemplo,* Publicación de la solicitud de la patente de los Estados Unidos Nº 20020025313), y recubrimiento del anticuerpo o fragmento activo de este en partículas de la lipoproteína de densidad baja (ver *por ejemplo,* Publicación de la solicitud de la patente de los Estados Unidos Nº 20040204354) o apolipoproteína E (*ver por ejemplo,* Publicación de la solicitud de la patente de los Estados Unidos Nº 20040131692).

Los anticuerpos de la invención se pueden formular, dosificar y administrar de un modo compatible con la buena práctica médica. Los factores para la consideración en este contexto incluyen el trastorno particular tratado, el mamífero particular tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el esquema de administración, y otros factores conocidos por los profesionales 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 efectiva de estos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores descriptos anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosis y con las vías de administración que se describen en la presente, o aproximadamente de 1 a 99% de las dosis descriptas en la presente, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine en forma empírica/clínica que es 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 diferentes) dependerá del tipo de enfermedad tratada, el tipo de anticuerpo, la gravedad o curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta del anticuerpo, y el criterio del médico que asiste. El anticuerpo se administra de modo adecuado al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. De acuerdo con el tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg–10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosis diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, de acuerdo con la condición, el tratamiento generalmente debe ser sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosis del anticuerpo puede estar en el rango de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En consecuencia, 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 estas) se pueden administrar al paciente. Tales dosis se pueden administrar en forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (*por ejemplo,* de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o *por ejemplo,* aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga más alta inicial, seguido por una o más dosis más bajas. Sin embargo, otros regimenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se considera que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti–BBB–R.

V. Artículos de manufactura

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descriptos anteriormente. El artículo de manufactura comprende un envase y una etiqueta en este o un prospecto asociado. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los

envases se pueden formar a partir de una variedad de materiales tal como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición efectiva para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la condición de elección. Más aún, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en este, donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, donde la composición comprende un agente citotóxico u otro tipo de agente terapéutico adicional. El artículo de manufactura en esta forma de realización de la invención también puede comprender un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. En forma alternativa o adicional, el artículo de manufactura también puede comprender un segundo (o tercer) envase que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales convenientes desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros buffer, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Se considera que cualquiera de los artículos de manufactura anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti–BBB–R.

El artículo de manufactura opcionalmente también comprende un prospecto con instrucciones para tratar un trastorno neurológico en un sujeto, donde las instrucciones indican que el tratamiento con el anticuerpo que se describe en la presente trata el trastorno neurológico, y opcionalmente indica que el anticuerpo tiene mejor captación a través de la BBB debido a su afinidad baja por el BBB–R.

III. EJEMPLOS

Este ejemplo evaluó el receptor de transferrina (TfR), que media el transporte de hierro en el cerebro por medio del complejo holo–transferrina (Skarlatos et al. *Brain Res* 683: 164–171 (1995)). Un anticuerpo del receptor de transferrina (anti–TfR^A) anti–murino quimérico humano que no compite con la unión de transferrina endógena al TfR se comparó con una IgG control humana en un experimento de marca doble para la captación en cerebro de ratón de tipo

salvaje. Se inyectó una dosis traza única (aproximadamente 50 g/kg) de [^{131}I]anti–TfR^{A} y [^{125}I]IgG control en ratones tipo salvaje por vía intravenosa (i.v.) y se midió la captación cerebral a 5 min., 0,5, 1, 4, 24, 48, y 72 horas. Un aumento significativo en la captación de [^{131}I]anti–TfR^{A} en el cerebro, medido como porcentaje de dosis inyectadas por gramo de cerebro, se observó en todos los puntos de tiempo (Fig. 1A). En su pico, 1 hora después de la inyección, hubo una diferencia de >11 veces en la acumulación de [^{131}I]anti–TfR^{A} en el cerebro en comparación con [^{125}I]IgG control (n=6). Si se coadministró también anti–TfR^{A} no marcado (4 mg/kg de peso corporal), la acumulación en cerebro de [^{131}I]anti–TfR^{A} casi se redujo al nivel de IgG control, lo que indica captación específica, dirigida al blanco.

Para evaluar si la captación de anticuerpo significativa en cerebro también ocurre en niveles de dosis terapéutica, los ratones tipo salvaje fueron administrados con anti–TfR^{A} o IgG control a razón de 20 mg/kg por vía intravenosa (i.v.). La concentración de anticuerpo humano en la corteza y suero se determinó a 1 y 24 horas después de la inyección usando un ELISA sándwich de Fc humano. En breves palabras, luego del tiempo de administración indicado, los ratones fueron perfundidos con D-PBS a una velocidad de 2ml/min durante 8 minutos. Los cerebros fueron extraídos y la corteza y el hipocampo fueron aislados, homogenizados en 1% NP-40 (Cal-Biochem) en PBS que contiene inhibidores de proteasas Complete Mini EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets (Roche diagnostics). Las muestras de cerebro homogenizadas se giraron a 4°C durante una hora antes de centrifugarlas a 14,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue aislado para medir el anticuerpo cerebral. La sangre entera se recolectó antes de la perfusión en tubos microcontenedores separadores de suero (BD Diagnostics), se dejó coagular por al menos 30 minutos, y se centrifugó a 5,000 x g durante 90 segundos. El sobrenadante fue aislado para mediciones de anticuerpo en suero. Las concentraciones de anticuerpo en las muestras de suero y cerebro de ratón se midieron mediante ELISA. Inmunoplacas NUNC de 384 pocillos Maxisorp (Neptune, NJ) fueron recubiertas con fragmento F(ab') de IgG anti-humana de asno, anticuerpo policlonal fragmento específico Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con PBS que contiene 0.5% BSA durante 1 hora a 25°C. Cada anticuerpo se usa como un estándar interno para cuantificar la respectiva concentración de anticuerpo. Las placas se lavaron con PBS que contiene 0.05% Tween-20 utilizando una lavadora de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc.,

Winoosky, VT). Los estándares y las muestras fueron diluidos en PBS que contiene 0.5% de BSA, 0.35 M de NaCl, 0.25% de CHAPS, 5mM de EDTA, 0.05% de Tween-20 y 15 ppm de Proclin, y se añadieron a la microplaca durante dos horas a 25°C. El anticuerpo unido se detecta con anti-IgG humana de cabra F(ab') 2 conjugada con peroxidasa de rábano picante, anticuerpo policlonal Fc-específico (jackson IMMunoResearch), desarrollado utilizando 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB) (KPL, Inc. Gaithersburg, MD) y la absorbancia se midió a 450 nm en un lector Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Las concentraciones se determinaron de una curva estándar utilizando un programa de regresión no lineal de cuatro parámetros. El ensayo presentó valores del límite de cuantificación inferior (LLOQ) de 3.12 ng/ml en suero y 15.6 ng/g en cerebro. El análisis estadístico de las diferencias entre los grupos experimentales se llevó a cabo utilizando una prueba t no emparejada de dos colas.

En comparación con la IgG control, la concentración de anti–TfR^A fue significativamente más alta en el cerebro 24 horas después de la administración del anticuerpo (Fig. 1B, p= 0,0002, n=10). Adicionalmente, la concentración de IgG humana en cerebro fue >2,5 veces más alta en comparación con el suero para anti–TfR^A en comparación con la IgG control a 24 horas (Fig 1C, p=0,003, n=10). En conjunto con los datos de traza radiomarcada, estos resultados indican que el anti–TfR^A administrado en forma sistémica se puede acumular en el cerebro, sin embargo, la distribución tisular del anticuerpo en el cerebro aún continúa sin entenderse.

Para tratar la distribución de los anticuerpos administrados sistémicamente en cerebro, a los ratones tipo salvaje se les inyectó 20 mg/kg i.v. con anti–TfR^A o IgG control, se perfundieron con PBS para lavar cualquier anticuerpo circulante restante, y las secciones cerebrales se tiñeron con IgG secundaria anti-humana fluorescente para determinar la localización del anticuerpo. Después de 1 hora de circulación, el anti–TfR^A presentó una distribución vascular pronunciada, indicada por su colocalización con el marcador de membrana basal anticolágeno IV (Fig 1D, columna izquierda). Aunque en forma menos pronunciada, la IgG control también se localizó en la vasculatura, lo que indica que después de 1 hora de exposición, los niveles de dosis terapéutica de la IgG administrada en forma sistémica mantienen una distribución vascular (Fig. 1E, columna izquierda). Sin embargo, hubo una diferencia marcada en la localización del anticuerpo 24 horas después de la inyección. La distribución de anti–TfR^A ya no fue exclusivamente vascular, sino que en cambio, presentó tinción parenquimática modesta (Fig. 1D,

columnas de la derecha). En contraste, el anticuerpo de IgG control estuvo en gran parte ausente en el tejido cerebral 24 horas después de la inyección (Fig. 1E, columnas de la derecha). Estos resultados indican que cuando se dosifica en niveles terapéuticamente relevantes, el anti–TfR^A puede penetrar la BBB lo cual se evidencia por la tinción parenquimática modesta; sin embargo, la masa del anticuerpo acumulado en cerebro fue principalmente confinada a las células endoteliales de la BBB.

La acumulación en el parénquima requiere la unión a los TfRs superficiales expresados en las células endoteliales cerebrales así como la disociación del receptor después de RMT. Sin estar ligados por teoría alguna, se postuló que la afinidad reducida por TfR puede facilitar la disociación después de RMT y permitió el aumento de acumulación en el parénquima. Además, un anti–TfR con afinidad reducida puede ser capturado y transportado menos eficientemente en un ambiente limitado por la concentración, tal como en el cerebro, donde las concentraciones de anti–TfR son bajas. En la práctica clínica, sin embargo, los niveles séricos de un anti–TfR terapéutico aún pueden ser suficientemente altos para mantener la saturación del receptor en el lumen vascular.

Para probar esta predicción, se generaron variantes de anti–TfR^A que varían en su afinidad de unión por TfR. Estas variantes fueron analizadas en un ensayo de competición ELISA (figura 2A); el anti-TfRA tuvo la afinidad más fuerte y el IC50 más bajo de cualquiera de los anticuerpos analizados para TfR, y cada uno de anti-$TfR^{B,C,D}$ tuvo sucesivamente afinidad más baja e IC50 más alto. Luego, se generó y ensayó una variante anti-TfR^E en el mismo ensayo junto con las variantes anti-$TfR^{A,B,C,D}$; como se muestra en la Fig. 2A, esta fue sustancialmente menos capaz para competir por unión a TfR que cualquiera de los otros anticuerpos anti-TfR analizados, y tuvo un correspondiente valor IC50 alto (Tabla 2).

Tabla 2: mediciones IC50 para anticuerpos anti-TfR

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	-

Estas variantes fueron probadas en un ambiente de no saturación de TfR (dosis traza) y de saturación de TfR (dosis terapéutica). Los niveles traza de [^{125}I]anti–TfR^A, [^{125}I]anti–TfR^B, [^{125}I]anti–TfR^C, [^{125}I]anti–TfR^D y [^{125}I]anti-TfR^E (que varían en 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 cerebral a 1, 4 o 24 horas después de la inyección. Este ensayo se llevó a cabo originalmente con [^{125}I]anti–TfR^A, [^{125}I]anti–TfR^B, [^{125}I]anti–TfR^C y [^{125}I]anti–TfR^D, y luego se repitió sobre la construcción de [^{125}I]anti-TfR^E, los resultados del cual se ilustran en la Figura 2B. En forma coherente con el modelo propuesto, los niveles de dosis traza de los anticuerpos anti–TfR de afinidad más baja produjeron menos captación en cerebro en comparación con las variantes de afinidad más alta (Fig. 2B). En sorprendente contraste con la dosificación de trazas, sin embargo, la captación cerebral de estas mismas variantes de afinidad más baja en niveles terapéuticos (20 mg/kg evaluada a 1 y 24 horas) tuvo una captación cerebral aumentada a 24 horas conforme la afinidad fue disminuida, a la vez que no se observó una diferencia significativa en la captación a 1 hora (Fig. 2C). Estos datos respaldan la hipótesis de que un anticuerpo RMT de afinidad más baja puede exhibir disminución del transporte en concentraciones limitantes a la vez que el transporte en condiciones de saturación no se ve afectado.

En consecuencia, se propone el siguiente modelo: en comparación con un anticuerpo de afinidad alta, pocos anticuerpos de afinidad baja se unen a los receptores en el lado luminal de la vasculatura en concentraciones de no saturación, lo que lleva a menor captación endotelial (Fig. 2D, paneles de la izquierda). A una dosis terapéutica más alta, sin embargo, los receptores luminales pueden estar saturados a pesar de la afinidad lo que produce similar captación endotelial (Fig. 2D, paneles de la derecha). En estas condiciones, los anticuerpos RMT de afinidad más baja pueden lograr una mayor acumulación cerebral por 1) maximización de la disociación del blanco RMT lo que facilita la liberación en el cerebro, y 2) reducción de la probabilidad del eflujo fuera del cerebro ya que las concentraciones son limitadas en el lado parenquimático de la BBB. En consecuencia en un contexto terapéutico, un anticuerpo de afinidad más

baja por un blanco RMT es sorprendentemente ventajoso para la acumulación parenquimática.

Para evaluar la localización de estas variantes que exhiben aumento de la captación cerebral, los ratones se dosificaron i.v. con 20 mg/kg del anti–TfR^{A} de afinidad alta o las variantes anti–$TfR^{B,C,D}$ de afinidad más baja. Después de 24 horas, los animales se perfundieron con PBS y las secciones de cerebro se cotiñeron para IgG humana y el marcador neuronal NeuN (Fig. 2E). Como se observó antes, los animales tratados con anti–TfR^{A} de afinidad alta presentaron principalmente tinción vascular con bajos niveles de señal parenquimática (Fig. 2E, fila superior). Sin embargo, los anti–$TfR^{B,C,D}$ de afinidad más baja presentaron tinción celular notablemente más pronunciada sin representar los vasos sanguíneos corticales (Fig. 2E, datos para anti-$TfR^{B,C,D}$). Además, la tinción colocalizada con NeuN indicó una redistribución del anticuerpo desde la vasculatura a las neuronas. Esto es especialmente pronunciado en una imagen de aumento más alto representativa de la variante anti–TfR^{D} (Fig. 2F). En conjunto con los datos de captación cerebral, estos resultados indican que se puede obtener una acumulación cerebral significativamente más alta del anticuerpo al reducir la afinidad de anti–TfR por TfR, y que los anticuerpos de afinidad más baja tal como anti-TfR^{D} se distribuyen selectivamente en las neuronas.

El transporte de los anticuerpos anti–TfR a través de la BBB se estableció adicionalmente cuando se evaluó un anticuerpo biespecífico (anti–TfR^{A}/BACE1) que se une a TfR y la enzima de escisión de la proteína precursora amiloide (APP), beta secretasa (BACE1) (Fig. 3A). El anti–TfR^{A} de afinidad alta se usó para manipular genéticamente el brazo de unión de TfR del biespecífico usando la tecnología de construcción de anticuerpo biespecífico "perilla en agujero" (ver, por ejemplo, Ridgway et al., Protein Eng. (1996) 9 (7): 617-621). Además de las mutaciones perilla y agujero en el Fc por anti-TfR (agujero) y anti-BACE1 (perilla), el brazo del anticuerpo comprendía una mutación en la región Fc que anuló la glicosilación (N297G). Los medio-anticuerpos perilla y agujero fueron purificados por separado y templados para generar una IgG biespecífica aglicosilada in vitro. La afinidad de unión del anticuerpo anti–TfR^{A}/BACE1 a TfR se redujo considerablemente en comparación con el anti–TfR^{A} original debido a la pérdida de unión bivalente (Fig. 3B). BACE1 se expresa principalmente en las neuronas en el SNC y se considera que es el principal contribuyente de la formación de beta amiloide ($A\beta_{1-40}$) por medio de la escisión de APP (Vassar et al., *Science* 286:735–741 (1999)). Un anticuerpo para BACE1 se ha descripto como un medio

efectivo para inhibir la actividad de BACE1, y puede reducir la producción de $A\beta_{1-40}$ *in vivo*. La inhibición de BACE1 por anti–TfR/BACE1 se examinó en una línea celular HEK293 que expresa en forma estable APP. En comparación con anti–BACE1, el anticuerpo biespecífico presentó similar eficacia y potencia 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 completamente funcional de la actividad de BACE1 (Fig. 3C).

Con base en este modelo, se puede esperar que este anticuerpo biespecífico de afinidad más baja sea un candidato más favorable para el aumento de 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/BACE1 con [^{125}I]anti–TfR^{A} y [^{125}I]anti–BACE1 y se evaluó la captación cerebral a 30 min, 6, 24, y 48 horas después de la inyección i.v. Se observó una captación cerebral significativamente más alta con [^{125}I]anti–TfR/BACE1 en comparación con [^{125}I]anti–BACE1 en todos los puntos de tiempo (Fig. 3D, n=4). En concordancia con la hipótesis de afinidad, la captación cerebral de esta dosis traza de no saturación de [^{125}I]anti–TfR fue mucho mayor que la de [^{125}I]anti–TfR^{A}/BACE1 de afinidad más baja. Para evaluar la acumulación del anticuerpo a niveles de dosis terapéutica, los ratones se inyectaron i.v. con anti–TfR/BACE1 o anti–BACE1 a razón de 20 mg/kg y se determinó la captación cerebral del anticuerpo después de 1, 12, 24, y 48 horas. En comparación con el anti–BACE1 monoespecífico, la administración del anti–TfR^{A}/BACE1 biespecífico produjo una captación cerebral significativamente más alta en todos los puntos de tiempo (Fig. 3E). Como se predijo con el modelo de afinidad, el grado de captación fue significativamente mayor que el anti–TfR^{A} de afinidad más alta solo (comparar la Fig. 3E a 1B). La acumulación pico se obtuvo a las 24 horas después de la inyección, alcanzando concentraciones de ~20 nM y permaneció elevada 48 horas después de la inyección, aun cuando los niveles periféricos de anticuerpo se eliminaron a ~12% de su concentración a 1 hora. El aumento de captación por el anticuerpo biespecífico es drásticamente evidente cuando se compara el porcentaje promedio de anticuerpo en el cerebro versus el suero (Fig. 3F).

Para determinar la localización de anti–TfR^{A}/BACE1 después de la administración sistémica, los ratones se perfundieron con PBS, 24 horas después de la inyección, y la distribución del anticuerpo se visualizó con anticuerpo secundario fluorescente anti–humano (Fig. 3G). Similar a la localización del anticuerpo anti–TfR de afinidad más baja, hubo una tinción sustancial del

parénquima además de la tinción vascular. La colocalización parenquimática con NeuN indicó que estos anticuerpos se localizaron en la población neuronal. En contraste, los animales a los que se inyectó la IgG control mostraron una falta completa de tinción tanto vascular como parenquimática. En conjunto, estos datos indican que el anti–TfR/BACE1 biespecífico atraviesa la BBB y se puede acumular significativamente en el parénquima del cerebro.

Para evaluar la eficacia de anti–TfR/BACE1 sobre la producción de $A\beta_{1-40}$ *in vivo*, a los ratones de tipo salvaje se les administró una dosis única de 25 mg/kg o 50 mg/kg de IgG control, anti–BACE1, o anti–TfR/BACE1. Sobre la base de la observación de que la captación cerebral del anticuerpo alcanza el pico 24 horas después de la inyección (ver Fig. 3E), se determinaron los niveles cerebrales y plasmáticos de $A\beta_{1-40}$ a 24 y 48 horas después de la administración i.v. del anticuerpo. A razón de 25 mg/kg, el anti–TfR/BACE1 pudo reducir significativamente los niveles de $A\beta_{1-40}$ cerebrales en comparación con IgG control tanto después de 24 ($p=0,001$, $n=10$) como 48 ($p=0,0003$, $n=10$) horas posinyección, mientras que el anti–BACE1 no tuvo efecto sobre la reducción de $A\beta_{1-40}$ (Fig. 4A). A 50 mg/kg, el anti–TfR/BACE1 tuvo un efecto aun más drástico sobre la reducción de $A\beta_{1-40}$ cerebral en ambos puntos de tiempo en comparación con la IgG control (Fig. 3B, $p< 0,0001$, $n=10$ para 24 y 48 hr). La administración de anti–BACE1 a esta dosis también redujo significativamente los niveles de $A\beta_{1-40}$ cerebrales en comparación con el control ($p<0,0001$, $n=10$ durante 24 hr; $p=0,006$, $n=10$ durante 48 hr), aunque en un grado significativamente menor que el anti–TfR/BACE1 biespecífico ($p<0,0001$, $n=10$ para 24 y 48 horas). De modo sorprendente, la capacidad del anticuerpo biespecífico para reducir $A\beta_{1-40}$ fue 2– a 3 veces mayor que el anti–BACE1 para todos los puntos de tiempo y dosis medidas. El efecto máximo de anti–TfR/BACE1 se obtuvo 48 horas después de la inyección a 50 mg/kg, con una reducción de 50,0 ± 1,9% en $A\beta_{1-40}$ cerebral en comparación con IgG control (Fig. 4E). También se observaron reducciones significativas en $A\beta_{1-40}$ periférico en ambas dosis y puntos de tiempo para anti–TfR/BACE1 (Fig. 4C–D). El tratamiento con anti–BACE1 produjo una reducción del $A\beta_{1-40}$ periférico solo en el punto de tiempo 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 manipulados genéticamente para cruzar la BBB pueden ser farmacodinámicamente eficaces. Además, el aumento de la penetración en cerebro del anticuerpo biespecífico lo convierte en un fármaco inhibidor de BACE1 más potente al reducir significativamente los niveles de $A\beta_{1-40}$ cerebrales.

A dosis terapéuticas de 20 mg/kg, sin embargo, la penetración en la BBB e ingreso en las porciones no vasculares del SNC aumentó en los animales tratados con anti-TfR^{E} con relación a los animales tratados con anti-TfR^{A} o anti-TfR^{D} (Figura 8B). De manera notable, el anti-TfR^{D} alcanzó una concentración inicial más alta en el cerebro, que disminuyó continuamente luego del día 2; por otra parte, el anti-fR^{E} retuvo consistentemente un nivel alto de exposición del cerebro a lo largo del período ensayado de 8 días. En relación con lo anterior, la concentración de anti-TfR^{E} en el suero fue la que menos disminuyó de todos los anticuerpos anti-TfR a lo largo del período evaluado (Figura 8A). A fin de cuentas, estos datos indican que generalmente una afinidad más baja por TfR de manera sorprendente reduce el aclaramiento del suero e incrementa la exposición del cerebro, pero que, a determinado umbral, la afinidad más baja comienza a impedir la máxima exposición del cerebro que se puede obtener con el anticuerpo. En este ejemplo, parecería que un óptimo se encontraría entre las afinidades de los anticuerpos anti-TfR^{D} y anti-TfR^{E} por el receptor de transferrina.

De forma importante, estos datos destacan varios mecanismos causales detrás del incremento de la captación de un anticuerpo en el SNC al utilizar un enfoque de anticuerpo de afinidad más baja. Primero, los anticuerpos anti-TfR de alta afinidad (por ejemplo, anti-TfR^{A}, Fig. 1D) limitan la captación del cerebro al saturar de manera rápida el TfR en la vasculatura cerebral, reduciendo así la cantidad total de anticuerpo tomada en el cerebro y restringiendo también su distribución a la vasculatura. De manera sorprendente, la disminución de la afinidad (por ejemplo, anti-TfR$^{B\text{-}E}$ y anti-TfR^{A,D,E}/BACE1, Fig. 2C, 2E, 2F, 3E-G y 9C) mejora la captación cerebral y distribución, con un robusto cambio observado en la localización desde la vasculatura a las neuronas y neuropilo asociado. Segundo, se ha propuesto que la afinidad más baja del anticuerpo por TfR impide la capacidad del anticuerpo para regresar al lado vascular de la BBB a través de TfR desde el lado SNC de la membrana, porque la afinidad global del anticuerpo por TfR es baja y la concentración local del anticuerpo en el lado SNC de la BBB no es de saturación, debido a la rápida dispersión del anticuerpo en el compartimento del SNC (ver, por ejemplo, Fig. 1D, 2E y 2F). Tercero, in vivo, los anticuerpos con menos afinidad por TfR no son limpiados del sistema tan eficientemente como aquellos con mayor afinidad por TfR (ver Fig. 8A y 9B), y permanecen así a concentraciones de circulación más altas que sus homólogos de afinidad más alta. Esto es ventajoso puesto que los niveles de circulación del anticuerpo de afinidad más baja se mantienen en niveles terapéuticos durante un

período de tiempo más largo que el anticuerpo de afinidad más alta, lo cual mejora luego la captación del anticuerpo en el cerebro durante un período de tiempo más largo (comparar anti-TfRA/BACE1 con anti-TfR^{D}/BACE1 en la Fig. 9C). Además, esta mejora tanto en plasma como en exposición en el cerebro puede reducir la frecuencia de dosificación en la práctica clínica, lo cual tendría un beneficio potencial no solamente para la conformidad y conveniencia del paciente sino también para reducir cualquier efecto secundario potencial o fuera de objetivo del anticuerpo y/o del compuesto terapéutico acoplado al mismo.

Se realizaron estudios adicionales para evaluar si una disminución adicional de la afinidad del anticuerpo biespecífico anti-TfR^{A}/BACE1 puede mejorar más su penetración en la BBB y en el parénquima. Se construyeron dos anticuerpos biespecíficos adicionales: anti-TfR^{D}/BACE1 y anti-TfR^{E}/BACE1, utilizando la misma metodología de construcción empleada para el anticuerpo anti-TfR^{A}/BACE1. Se llevaron a cabo ensayos de competición ELISA (Figura 9A) y los IC50 resultantes son como sigue:

Tabla 3: IC50/medidas de afinidad para anticuerpos anti-TfR/BACE1

Anticuerpo	IC50	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 uno de los anticuerpos biespecíficos y TfR. El análisis BIACORE® en la Tabla 3 se llevó a cabo como sigue. Kd fue medido usando ensayos de resonancia de plasmón superficial empleando un BIACORE®-T-100 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C usando captura penta-His Ab (Qiagen, Valencia, CA). En breves palabras, chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) fueron activados 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 100 mM de acetato de sodio, pH 4.0, a 50 µg/ml antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para alcanzar aproximadamente 10000 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección del anticuerpo, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para las medidas de

cinética, se inyectó MuTfR-His en HBS-P para llegar a aproximadamente 50 RU; luego se inyectaron diluciones seriadas dobles 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 velocidad de flujo de aproximadamente 30 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y tasas de disociación (k_{off}) se calcularon por medio de un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (Software de evaluación BIACORE® versión 3.2) por ajuste simultáneo de los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la relación de koff/kon. Ver, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865–881 (1999).

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 menos a TfR que los correspondientes monoespecíficos anti-TfR^A y anti-TfR^D (comparar la Fig. 9A con la Fig. 2A). Para el anti-TfR^E/BACE1, las curvas de unión parcial para el biespecífico y monoespecífico sugieren también que el anti-TfR^E/BACE1 biespecífico presenta un IC50 mucho más alto que el correspondiente anti-TfR^E monoespecífico.

Estos anticuerpos fueron probados en el mismo ensayo de producción $A\beta_{1-40}$ *in vivo* descrito anteriormente. En breves palabras, se administró a ratones C57B1/6 de tipo salvaje, de 6-8 semanas de edad, por vía i.v. una inyección en la vena de la cola, de una dosis única de 50mg/kg de IgG control, anti-BACE1 monoespecífico, o anti-TfR^A/BACE1, anti-TfR^D/BACE1, o anti-TfR^E/BACE1, 6 ratones por tratamiento de anticuerpo por punto de tiempo, para un total de 180 ratones tratados. Se determinaron los niveles de $A\beta_{1-40}$ en cerebro y plasma a 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días luego de la administración i.v. del anticuerpo (Figuras 9B-9E). La concentración de anticuerpos biespecíficos encontrada en el cerebro (Figura 9C) en el punto de tiempo más temprano fue la mayor con anti-TfR^A/BACE1 y anti-TfR^D/BACE1, cada uno de los cuales tuvo concentraciones de más del doble de la concentración lograda por el anti-TfR^E/BACE1 en el día 1 de punto de tiempo. Sin embargo, los niveles de concentración en cerebro de anti-TfR^A/BACE1 retornaron a los niveles de control alrededor del día 6, y los niveles de anti-TfR^D/BACE1 lo hicieron alrededor del día 10. En contraste, el anticuerpo anti-TfR^E/BACE1 biespecífico de más baja afinidad tuvo una disminución relativa mucho más baja en la concentración de anticuerpo en cerebro, en comparación con anti-TfR^A/BACE1 y anti-TfR^D/BACE1, de acuerdo con el modelo propuesto de que una afinidad más baja por anti-TfR conduce a una habilidad reducida para que el anticuerpo sea exportado desde el espacio parenquimal. Los niveles de Abeta1-40

en el cerebro (Figura 9E) fueron reducidos en más o menos la misma proporción esperada para las concentraciones observadas de anticuerpo biespecífico en el cerebro: anti-TfR^{A}/BACE1 y anti-TfR^{D}/BACE1 tuvieron niveles reducidos similares de Abeta1-40 cerebral observado en los puntos de tiempo más tempranos (días 1-2), que se incrementaron rápidamente en los puntos de tiempo posteriores (anti-TfR^{A}/BACE1), o se incrementaron con mayor moderación en los puntos de tiempo subsiguientes (anti-TfR^{D}/BACE1), de acuerdo con las disminuciones observadas en la concentración cerebral de cada uno de estos anticuerpos (Figura 9C). De manera notable, mientras el tratamiento con el anticuerpo anti-TfR^{E}/BACE1 resultó en una relativamente más modesta reducción en los niveles de Abeta1-40 en el cerebro que los observados con los otros anticuerpos biespecíficos, esta reducción fue consistente a través de todos los puntos de tiempo (Figura 9E).

Las medidas en plasma (Figura 9B) mostraron que el anti-TfR^{A}/BACE1 fue limpiado por el día 4, mientras que el anti-TfR^{D}/BACE1 persistió a niveles relativamente bajos a través de todos los puntos de tiempo, y los niveles de anti-TfR^{E}/BACE1 permanecieron similares a los controles en todos los puntos de tiempo. De manera consistente con este hallazgo, los niveles de Abeta1-40 observados en plasma (Figura 9D) fueron similarmente reducidos desde los niveles anti-gD control en todos los puntos de tiempo con cada uno de anti-TfR^{D}/BACE1, anti-TfR^{E}/BACE1 y anti-BACE1. Anti-TfR^{A}/BACE1 mostró reducciones similares en los puntos de tiempo de 1, 2 y 4 días, retornando rápidamente a los niveles de control en los puntos de tiempo posteriores, de acuerdo con la desaparición observada de los anticuerpos del plasma.

Estos resultados demuestran nuevamente que los anticuerpos anti-TfR/BACE1 biespecíficos efectivamente cruzan la BBB e inhiben la actividad de BACE1 en un mamífero, en un sistema 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 hace notar, sin embargo, que para cada blanco cerebral, la potencia del brazo biespecífico, específico para ese blanco, determinará qué cantidad del anticuerpo biespecífico anti-TfR/blanco debe estar presente en el lado SNC de la BBB a fin de alcanzar los resultados deseados, y así qué grado de afinidad del anti-TfR por TfR se debe usar en el biespecífico para obtener la concentración. Esta invención proporciona un medio para determinar y diseñar el anticuerpo biespecífico para alcanzar tales niveles objetivo en el SNC luego de la administración en el lado no privilegiado de la BBB.

Estos resultados fueron confirmados y extendidos utilizando otro anticuerpo biespecífico anti-TfR, anti-TfR/Abeta, que une tanto TfR como amiloide beta. Se prepararon tres variantes biespecíficas: anti-TfR^{A}/Abeta, anti-TfR^{D}/Abeta y anti-TfR^{E}/Abeta, utilizando los mismos métodos empleados para la preparación del anti-TfR/BACE1 biespecífico antes descrito. Abeta es el principal sustituyente de las placas amiloide, que se cree están involucradas en el desarrollo de la EA. La inhibición de la formación de placa mediante unión Abeta y remoción, ya sea en su estado libre u oligomerizado, puede inhibir el desarrollo o o progresión de la EA. Las propiedades farmacocinéticas de cada uno de estos anticuerpos biespecíficos fueron evaluadas.

Una dosis única de 50 mg/kg de IgG control, anticuerpo anti-Abeta monoespecífico, o cada anticuerpo biespecífico fue inyectada por vía i.p. en ratones C57BL/6J de tipo salvaje, de 8-16 semanas de edad, o ratones que expresan tanto presenilina 2 humana como proteína precursora de amiloide humana (PS2APP). Debido al número limitado de animales transgénicos, se ensayaron solamente dos de las variantes biespecíficas (anti-TfR^{D}/Abeta y anti-TfR^{E}/Abeta) en los ratones PS2APP. Cuatro a seis ratones replicados fueron dosificados en cada grupo de tratamiento. Los ratones fueron sacrificados luego de 24 horas y se midieron los niveles de fármaco tanto en cerebro como en plasma, al igual que en los estudios de los anti-TfR/BACE1 biespecíficos. Antes del sacrificio, se recolectó también sangre 6 horas luego la dosis para una evaluación temprana de las concentraciones de anticuerpo en plasma. Las mediciones de concentración de anticuerpo en plasma (Figuras 10A y 11A) mostraron que todos los anticuerpos estaban presentes en niveles similares a las 6 horas posteriores a la dosis. Sin embargo, los niveles de anti-Abeta monoespecífico control estaban reducidos en comparación con IgG control alrededor de las 24 horas. Esto es similar a las observaciones previas para la molécula anti-Abeta. A las 24 horas, el anti-TfR^{A}/Abeta mostró similares niveles de anticuerpo en la periferia que el anti-Abeta, mientras que el anti-TfR^{D}/Abeta y el anti-TfR^{E}/Abeta mostraron niveles ligeramente elevados, intermedios entre anti-Abeta e IgG control.

La concentración de anticuerpos biespecíficos encontrada en el cerebro estaba incrementada en comparación tanto con IgG control como con anti-Abeta (Figura 10B y 11B). En comparación con anti-Abeta, el anti-TfR^{A}/Abeta tuvo concentraciones 12 veces más altas, el anti-TfR^{D}/Abeta tuvo concentraciones 8 a 15 veces más altas, y el anti-TfR^{E}/Abeta tuvo concentraciones 4 a 5 veces más

altas. El incremento en la captación cerebral de los anticuerpos anti-TfR^{A,D,E}/Abeta en comparación con anti-Abeta fue aún mayor que los incrementos observados para los anticuerpos biespecíficos anti-TfR^{A,D,E}/BACE en comparación con BACE1. Esto se debe probablemente a la disminución de la exposición periférica de anti-Abeta en comparación con IgG control 24 horas luego de la dosis, lo cual resultó en niveles más bajos de anti-Abeta en cerebro, en comparación con IgG control.

Estos hallazgos son la primera demostración de que los anticuerpos de molécula grande administrados en dosis terapéuticamente relevantes pueden atravesar la BBB y producir captación cerebral significativa y sostenida. Además, estos resultados, que demuestran una relación inversa entre la afinidad del anticuerpo y el grado de captación cerebral, promueven la comprensión de la dinámica de RMT. Esta nueva perspectiva se puede aplicar a una variedad de otros potenciales blancos de RMT para proporcionar una estrategia más efectiva para la administración de fármacos por anticuerpos en el SNC. En forma adicional, estos resultados *in vivo* demuestran que un anticuerpo biespecífico puede mejorar mucho la potencia de una terapéutica anti–amiloidogénica promisoria al aumentar significativamente la penetración cerebral del anticuerpo fármaco dirigido. Esto podría ser muy ventajoso, ya que el aumento de administración del fármaco puede traducirse en menos efectos secundarios potenciales debido a la menor dosis terapéutica requerida. Más generalmente, esta tecnología tiene vasto potencial para aplicarse a la terapéutica para una amplia variedad de enfermedades del SNC y representa un mejor abordaje para proporcionar fármacos de anticuerpo más seguros.

Si bien la precedente invención se ha descripto en cierto detalle por medio de la ilustración y ejemplo para los fines de claridad de comprensión, las descripciones y los ejemplos no se deben interpretar como una limitación del alcance de la invención. Las revelaciones de todas las patentes y bibliografía científica citadas en la presente están expresamente incorporadas en su totalidad a modo de referencia.

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 a un receptor de la barrera hematoencefálica (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. Un método de incrementar la exposición del SNC a un compuesto, donde el compuesto está acoplado a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R, incrementando así la exposición del SNC al compuesto.

3. Un método para disminuir la eliminación de un compuesto administrado a un sujeto, donde el compuesto está acoplado a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R, de modo que se disminuye la eliminación del compuesto.

4. Un método para aumentar la retención en el SNC de un compuesto administrado a un sujeto, donde el compuesto está acoplado a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R, de modo que se aumenta la retención del compuesto en el SNC.

5. Un método para optimizar la farmacocinética y/o farmacodinámica de un compuesto para ser eficaz en el SNC en un sujeto, donde el compuesto está acoplado a un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R, y el anticuerpo es seleccionado de modo que su afinidad por el BBB-R, luego de acoplarse al compuesto, resulta en una cantidad de transporte del anticuerpo conjugado al compuesto a través de la BBB que optimiza la farmacocinética y/o farmacodinámica del compuesto en el SNC.

6. Un método para tratar un trastorno neurológico en un mamífero, que comprende tratar al mamífero con un anticuerpo que se une a un BBB-R y está acoplado a un compuesto, donde el anticuerpo ha sido seleccionado para tener una baja afinidad por el BBB-R y mejorar así la captación del anticuerpo y el compuesto acoplado por parte del SNC.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el compuesto es un fármaco para trastornos neurológicos o un agente de

imagen.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde el aumento o disminución se miden con relación a un anticuerpo típico que no tiene afinidad disminuida por el BBB-R.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo no afecta la unión del BBB-R a uno o más de sus ligandos nativos.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la barrera hematoencefálica está en un mamífero.

11. El método de la reivindicación 10, donde el mamífero tiene un trastorno neurológico.

12. El método de la reivindicación 11, donde el trastorno neurológico es seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrópica (ELA), fibrosis cística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión traumática del cerebro.

13. El método de la reivindicación 10 donde el mamífero es un humano.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo tiene un IC50 por el BBB-R de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 µM.

15. El método de la reivindicación 8, donde el IC50 es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 µM.

16. El método de la reivindicación 8, donde el IC50 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 µM.

17. El método de la reivindicación 8, donde el IC50 es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 µM.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 µM.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo acoplado al compuesto tiene una afinidad por el BBB-R de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 µM.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el

BBB-R es seleccionado del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (receptor de IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 8 (LRP8), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1), y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF).

21. El método de la reivindicación 20, donde el BBB-R es el receptor de transferrina.

22. El método de la reivindicación 21, donde el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a trasferrina.

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo acoplado al compuesto es administrado en una dosis terapéutica.

24. El método de la reivindicación 23, donde la dosis terapéutica es de saturación de BBB-R.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto opcionalmente forma una porción del anticuerpo multiespecífico.

26. El método de la reivindicación 25 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.

27. El método de la reivindicación 26, 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 método de la reivindicación 26, donde el anticuerpo multiespecífico une TfR y BACE1.

29. El método de la reivindicación 26, donde el anticuerpo multiespecífico une TfR y Abeta.

30. 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.

31. El método de la reivindicación 30, donde la afinidad por el BBB-R es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM.

32. El método de la reivindicación 30, donde el anticuerpo tiene un IC50 de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM.

33. El método de la reivindicación 30 donde el anticuerpo es seleccionado a partir de un panel de anticuerpos con base en la afinidad del anticuerpo seleccionado.

34. El método de la reivindicación 30 donde el anticuerpo está diseñado para tener la afinidad.

35. El método de la reivindicación 30 que comprende acoplar el anticuerpo con un compuesto terapéutico.

36. El método de la reivindicación 35 donde el compuesto terapéutico es un fármaco para trastornos neurológicos.

37. El método de la reivindicación 30 que 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.

38. Un anticuerpo que se une a un BBB-R, donde la afinidad del anticuerpo por el BBB-R es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μM.

39. El anticuerpo de la reivindicación 38 donde la afinidad es de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 1 μM.

40. El anticuerpo de la reivindicación 38 donde el BBB-R es seleccionado del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (receptor de IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 8 (LRP8), proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de densidad baja 1 (LRP1), y factor de crecimiento tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB–EGF).

41. El anticuerpo de la reivindicación 40 donde el BBB-R es receptor de transferrina (TfR).

42. El anticuerpo de la reivindicación 40 donde el BBB-R es receptor

de insulina.

43. El anticuerpo de la reivindicación 38 donde el BBB-R es un BBB-R humano.

44. El anticuerpo de la reivindicación 38 que está acoplado con un fármaco para trastornos neurológicos.

45. El anticuerpo de la reivindicación 44 que es 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.

46. El anticuerpo de la reivindicación 45 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.

47. El anticuerpo de la reivindicación 46 donde el antígeno cerebral es BACE1.

48. El anticuerpo de la reivindicación 46 donde el antígeno cerebral es Abeta.

49. El anticuerpo de la reivindicación 38 el cual es un fragmento de anticuerpo con una región de unión al antígeno que une el BBB-R.

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

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

52. Uso de un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico.

53. Uso del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 38-51 para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico.

54. Un anticuerpo que se une con baja afinidad a un BBB-R para uso en el tratamiento de un trastorno neurológico.

55. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 38-51 para uso en el tratamiento de un trastorno neurológico.

RESUMEN DE LA REVELACIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a los receptores de la barrera hematoencefálica (BBB–R) y los métodos de usar los mismos.

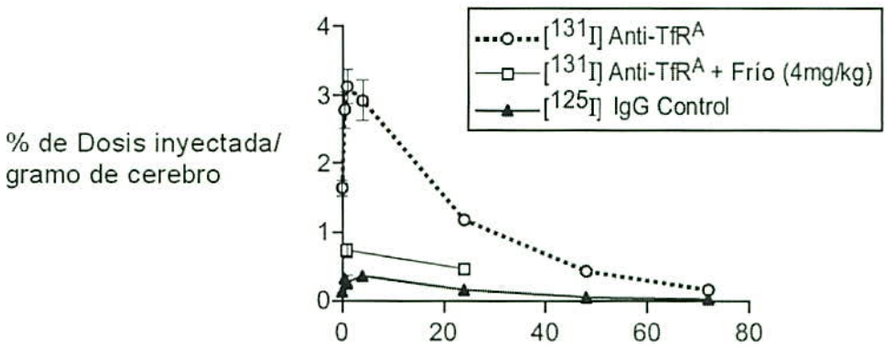


FIG. 1A

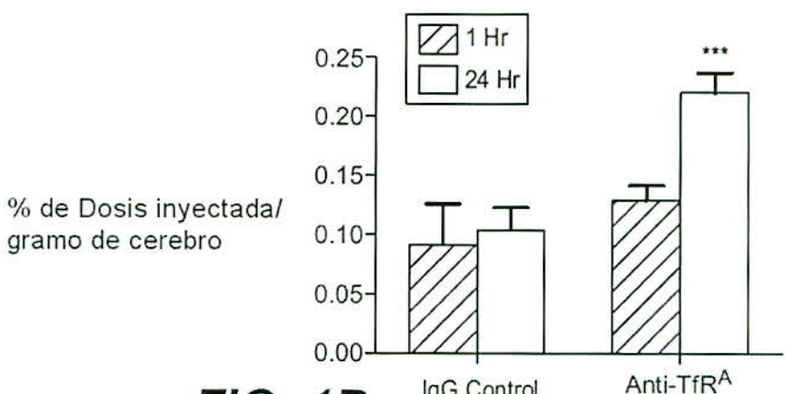


FIG. 1B

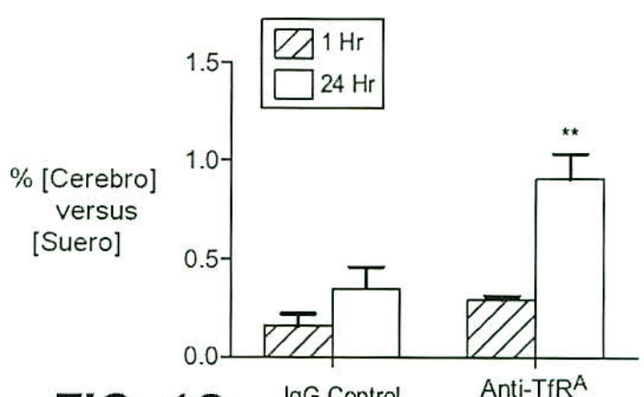


FIG. 1C

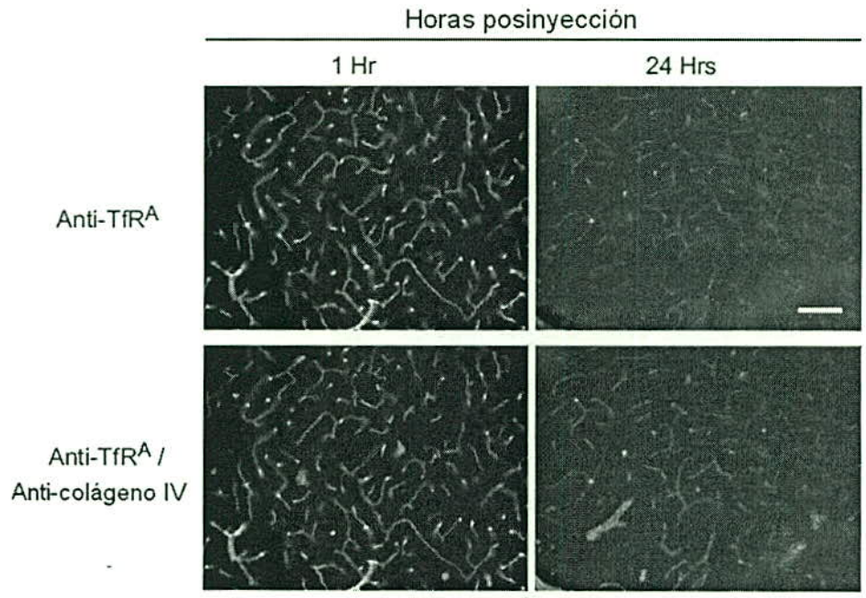

Horas posinyección
1 Hr
24 Hrs
Anti-TfR^A
Anti-TfR^A /
Anti-colágeno IV

FIG. 1D

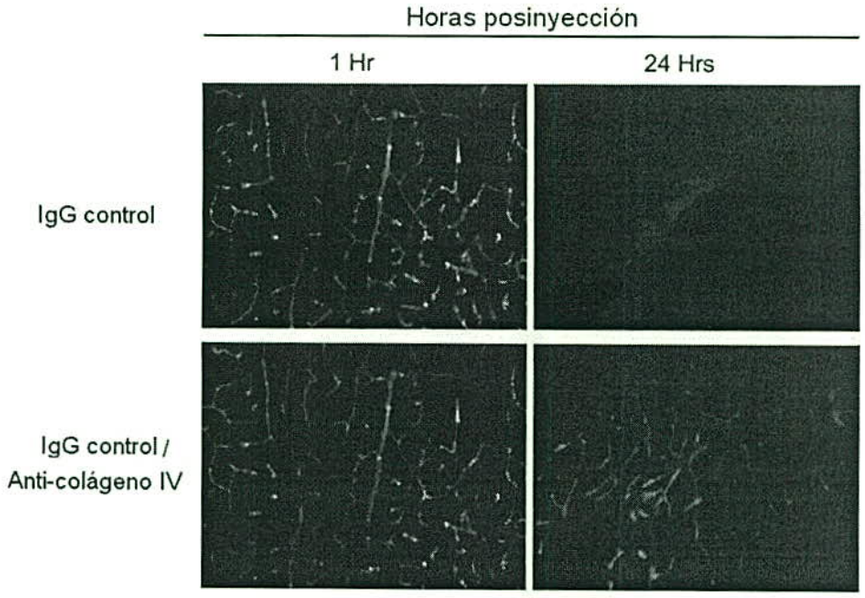

Horas posinyección
1 Hr
24 Hrs
IgG control
IgG control /
Anti-colágeno IV

FIG. 1E

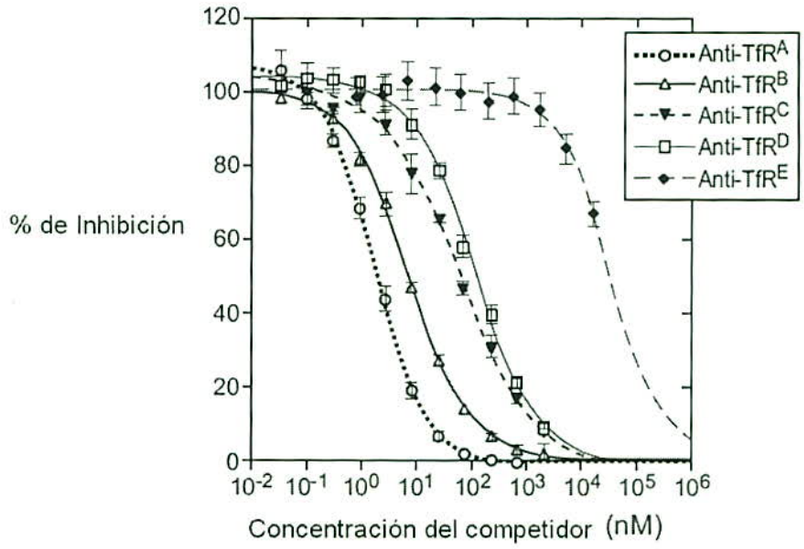

% de Inhibición
120
100
80
60
40
20
0
10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5} 10^{6}
Concentración del competidor (nM)
Anti-TfR^{A}
Anti-TfR^{B}
Anti-TfR^{C}
Anti-TfR^{D}
Anti-TfR^{E}

FIG. 2A

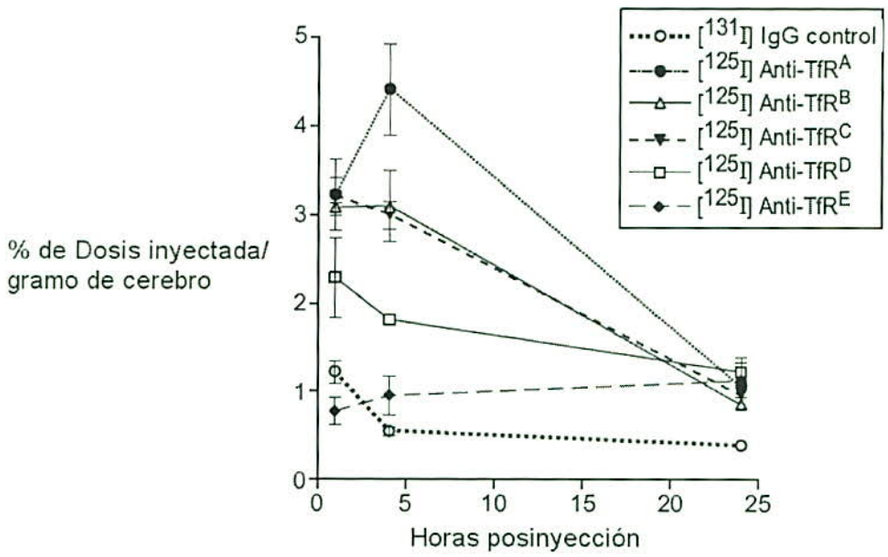

% de Dosis inyectada/
gramo de cerebro
5
4
3
2
1
0
0
5
10
15
20
25
Horas posinyección
[^{131}I] IgG control
[^{125}I] Anti-TfR^{A}
[^{125}I] Anti-TfR^{B}
[^{125}I] Anti-TfR^{C}
[^{125}I] Anti-TfR^{D}
[^{125}I] Anti-TfR^{E}

FIG. 2B

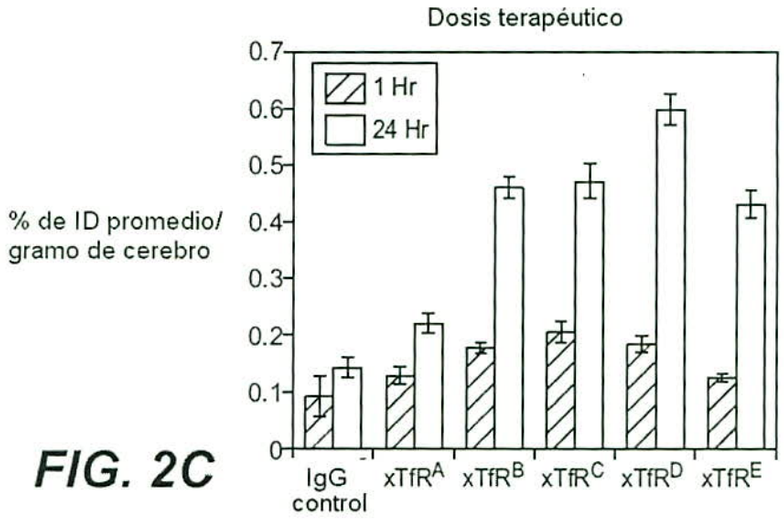

Dosis terapéutico
% de ID promedio/ gramo de cerebro
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1 Hr
24 Hr
IgG control
xTfR^A
xTfR^B
xTfR^C
xTfR^D
xTfR^E

FIG. 2C

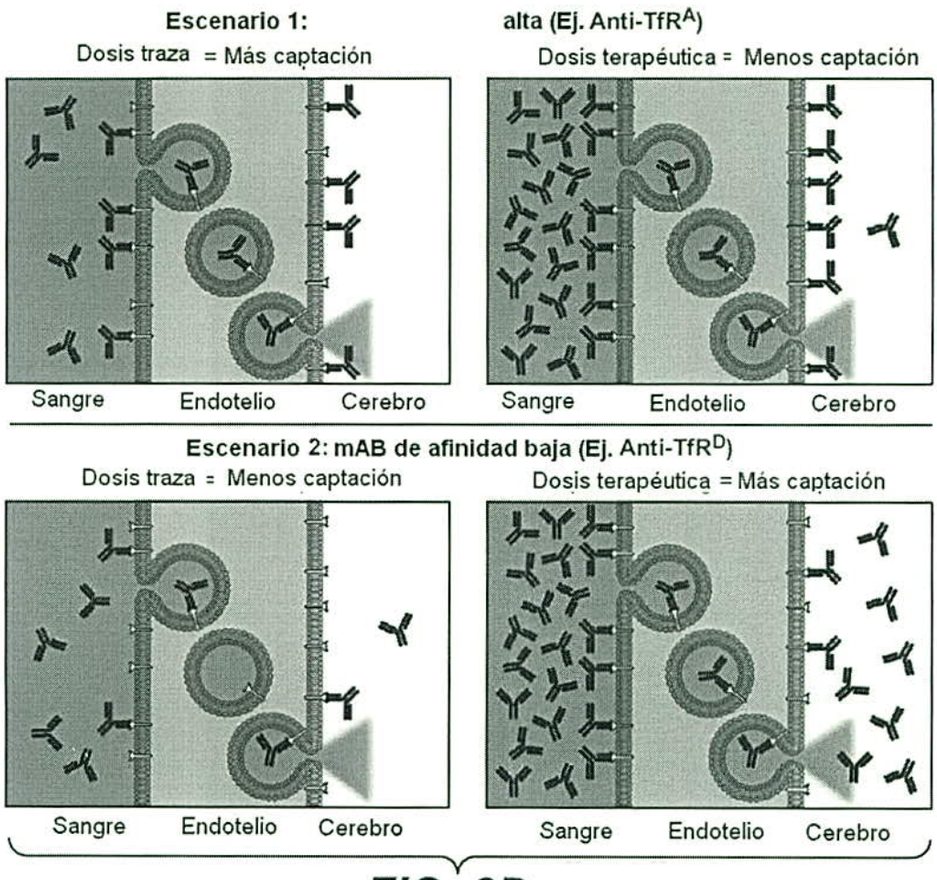

Escenario 1:
alta (Ej. Anti-TfR^{A})
Dosis traza = Más captación
Dosis terapéutica = Menos captación
Sangre
Endotelio
Cerebro
Sangre
Endotelio
Cerebro
Escenario 2: mAB de afinidad baja (Ej. Anti-TfR^{D})
Dosis traza = Menos captación
Dosis terapéutica = Más captación
Sangre
Endotelio
Cerebro
Sangre
Endotelio
Cerebro

FIG. 2D

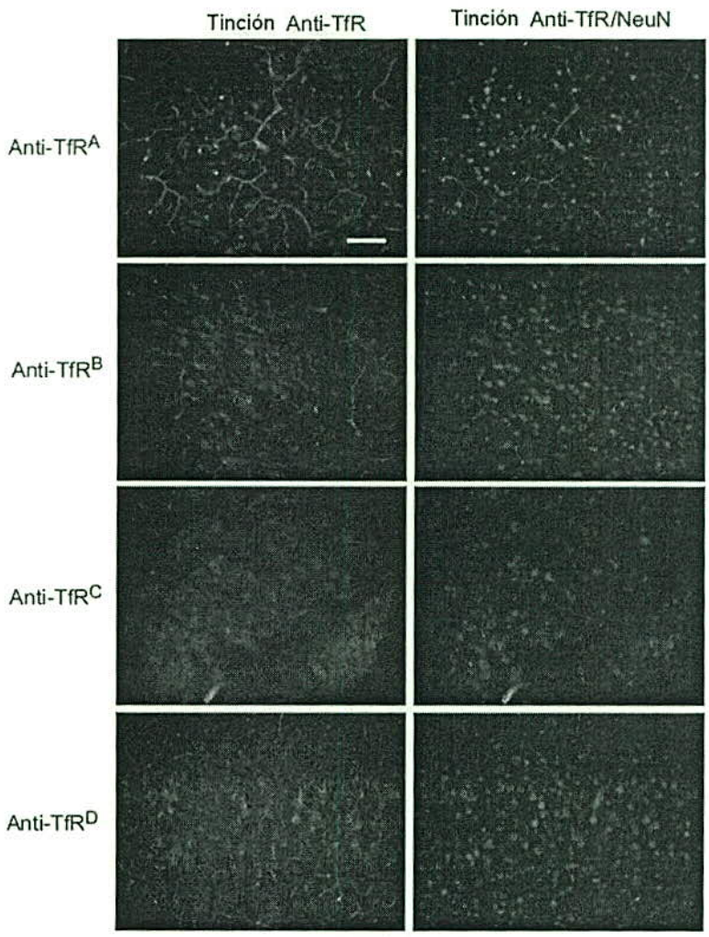

Tinción Anti-TfR
Tinción Anti-TfR/NeuN
Anti-TfR^{A}
Anti-TfR^{B}
Anti-TfR^{C}
Anti-TfR^{D}

FIG. 2E

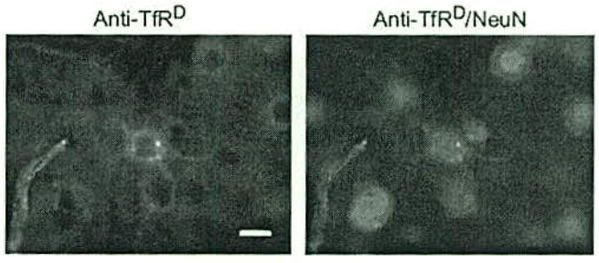

Anti-TfR^{D}
Anti-TfR^{D}/NeuN

FIG. 2F

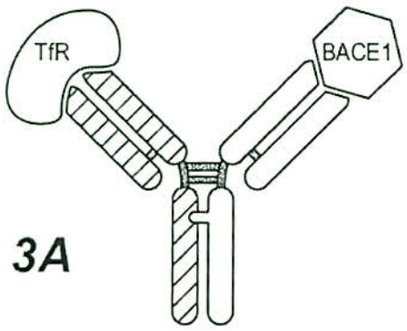


FIG. 3A

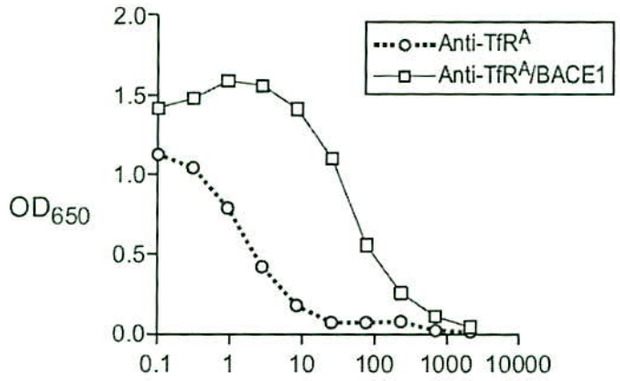


FIG. 3B

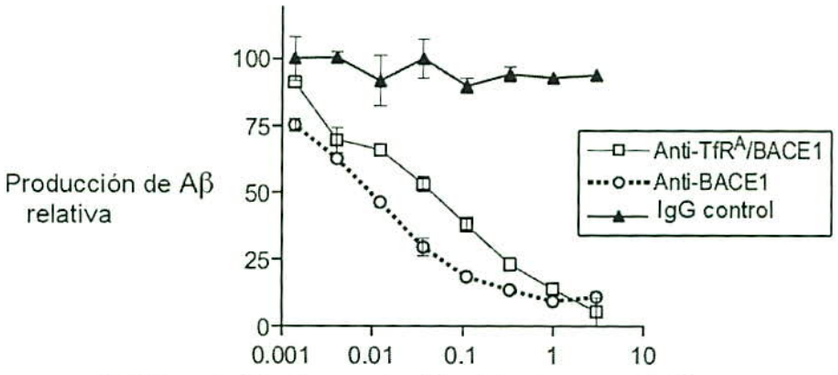


FIG. 3C

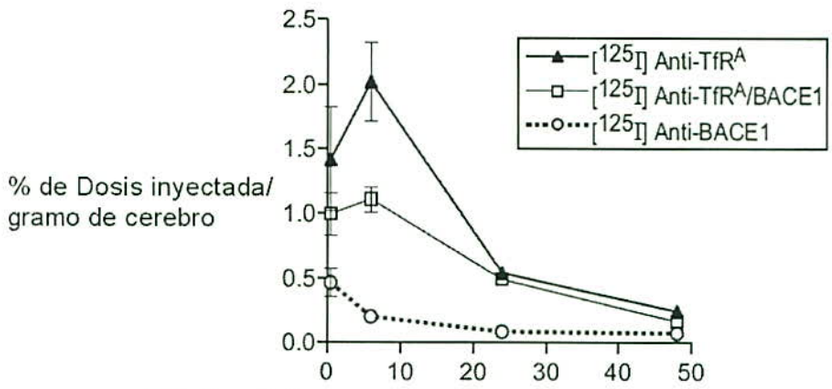


FIG. 3D

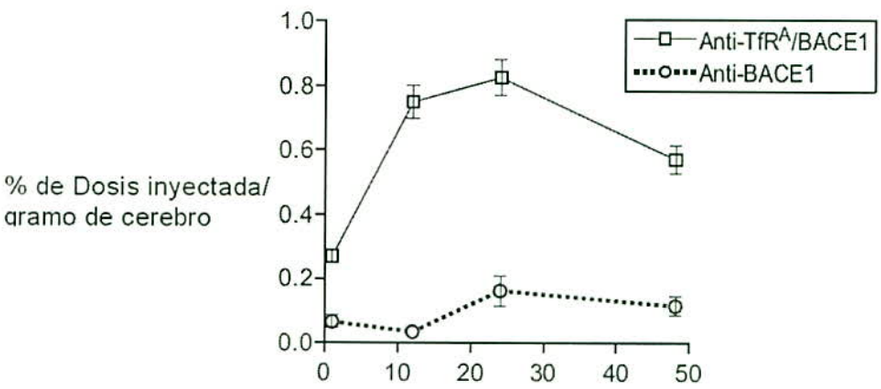


FIG. 3E

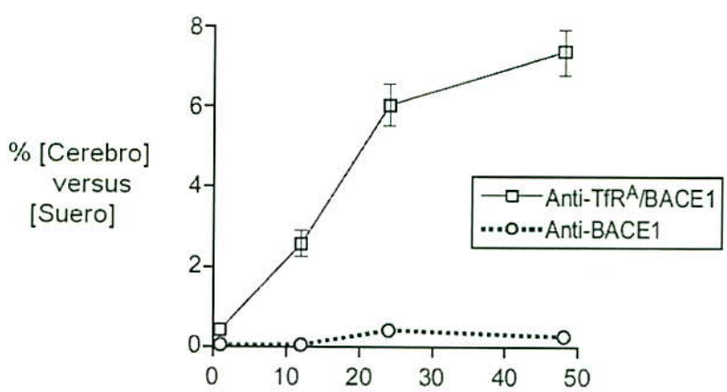


FIG. 3F

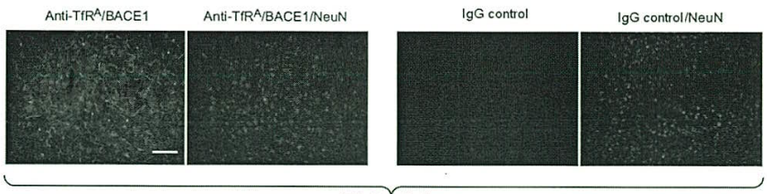

Anti-TfR^A/BACE1
Anti-TfR^A/BACE1/NeuN
IgG control
IgG control/NeuN

FIG. 3G

FIG. 4A

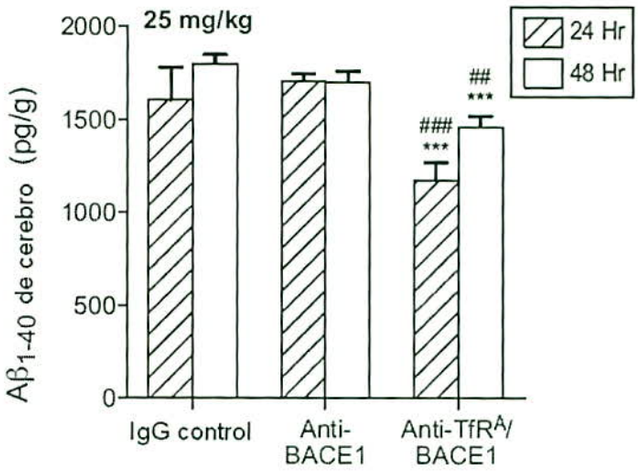


FIG. 4B

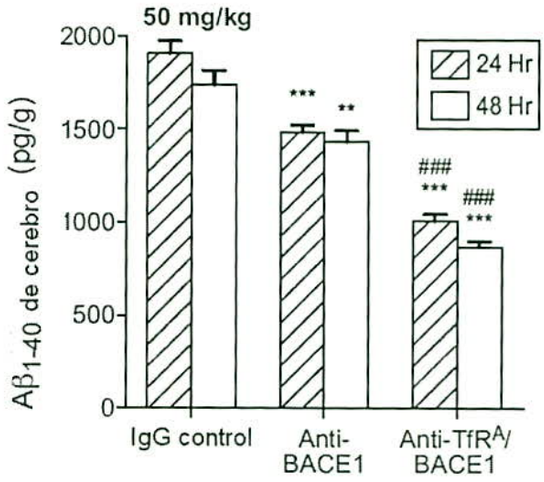


FIG. 4C

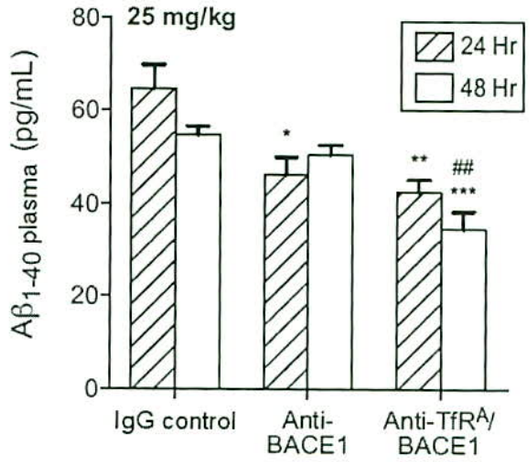


FIG. 4D

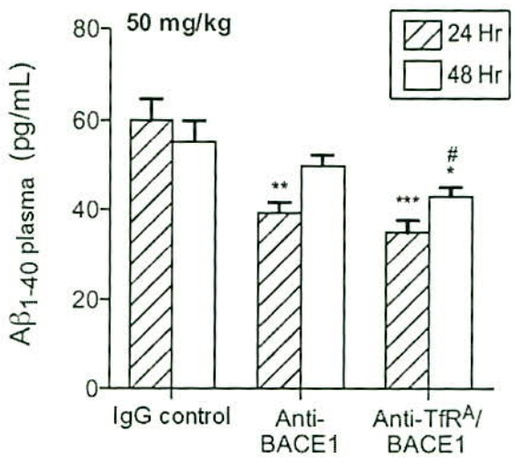
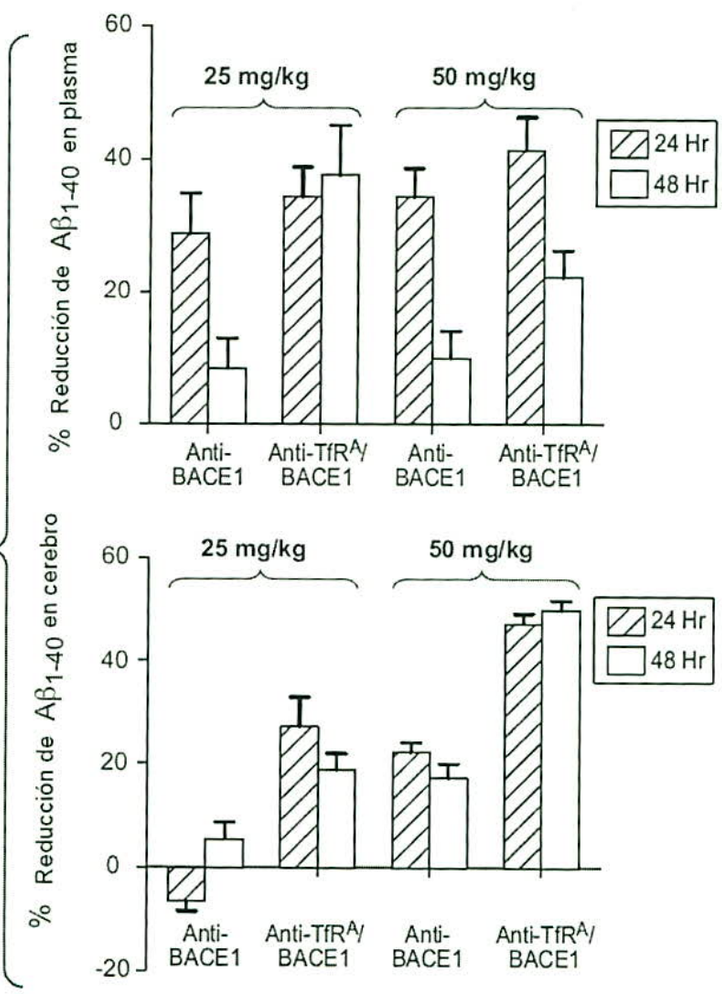

50 mg/kg
24 Hr
48 Hr
$A\beta_{1-40}$ plasma (pg/mL)
80
60
40
20
0
**
***
#
*
IgG control
Anti-BACE1
Anti-TfR^A/BACE1

FIG. 4E


% Reducción de $A\beta_{1-40}$ en plasma
60
40
20
0
25 mg/kg
50 mg/kg
24 Hr
48 Hr
Anti-BACE1
Anti-TfR^A/BACE1
Anti-BACE1
Anti-TfR^A/BACE1
% Reducción de $A\beta_{1-40}$ en cerebro
60
40
20
0
-20
25 mg/kg
50 mg/kg
24 Hr
48 Hr
Anti-BACE1
Anti-TfR^A/BACE1
Anti-BACE1
Anti-TfR^A/BACE1

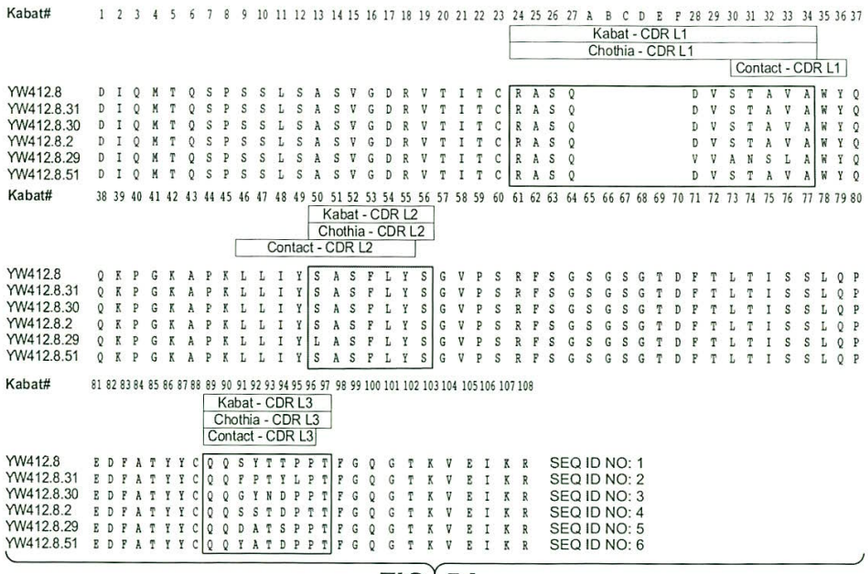

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contact - CDR L1
YW412.8 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V 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 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 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 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 V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
Kabat#
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
Chothia - CDR L2
Contact - 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 F 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 F 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 F 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 F 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 F 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 F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
Kabat#
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
Chothia - CDR L3
Contact - CDR L3
YW412.8 E D F A T Y Y C Q 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 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 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 Q S S T D P T 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 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 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

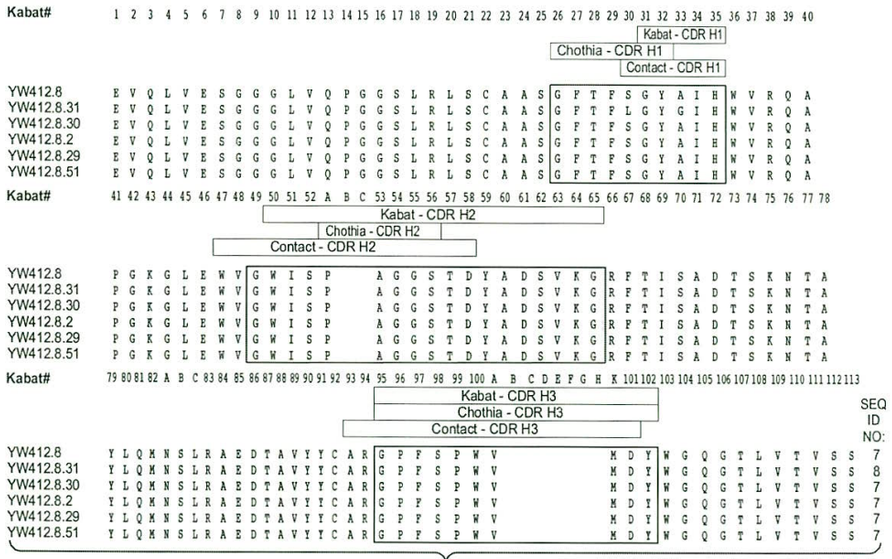

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contact - CDR H1
YW412.8 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
YW412.8.31 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L 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 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 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 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 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#
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
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contact - CDR H2
YW412.8 P G K G L E W V G W I S P A G 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 W I S P A G 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 W I S P A G 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 W I S P A G 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 W I S P A G 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 W I S P A G 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#
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
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contact - CDR H3
SEQ ID NO:
YW412.8 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7
YW412.8.31 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 8
YW412.8.30 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7
YW412.8.2 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7
YW412.8.29 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7
YW412.8.51 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7

FIG. 5B

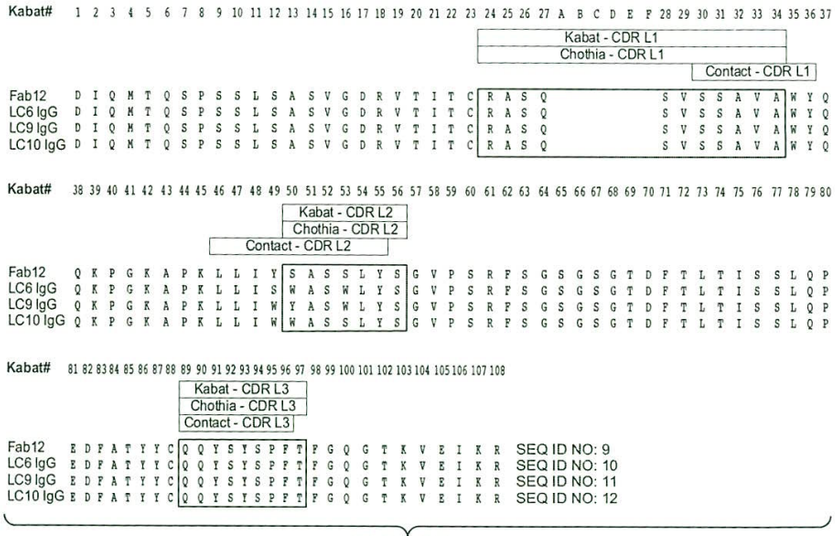

Kabat#
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contact - CDR L1
Fab12 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
LC6 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
LC9 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
LC10 IgG D I Q M T Q S P S 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 W Y Q
Kabat#
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contact - CDR L2
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
LC6 IgG Q K P G K A P K L L I S W 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 W 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#
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contact - CDR L3
Fab12 E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 9
LC6 IgG E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 10
LC9 IgG E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 11
LC10 IgG E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 12

FIG. 6A

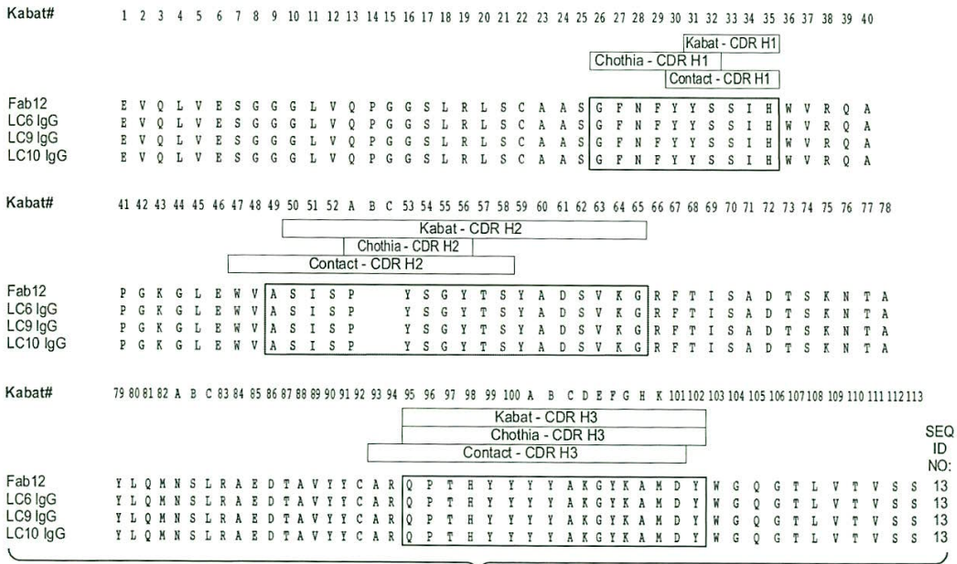

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contact - CDR H1
Fab12 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
LC6 IgG E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
LC9 IgG E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
LC10 IgG E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
Kabat#
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
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contact - CDR H2
Fab12 P G K G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
LC6 IgG P G K G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
LC9 IgG P G K G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
LC10 IgG P G K G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
Kabat#
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
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contact - CDR H3
SEQ ID NO:
Fab12 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 13
LC6 IgG Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 13
LC9 IgG Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 13
LC10 IgG Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 13

FIG. 6B

```
  1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAS
 51 INSNGGSTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCASGD
101 YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT
151 VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT KTYTCNVDHK
201 PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
251 VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV
301 LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM
351 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL 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 LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)
```

FIG. 7B

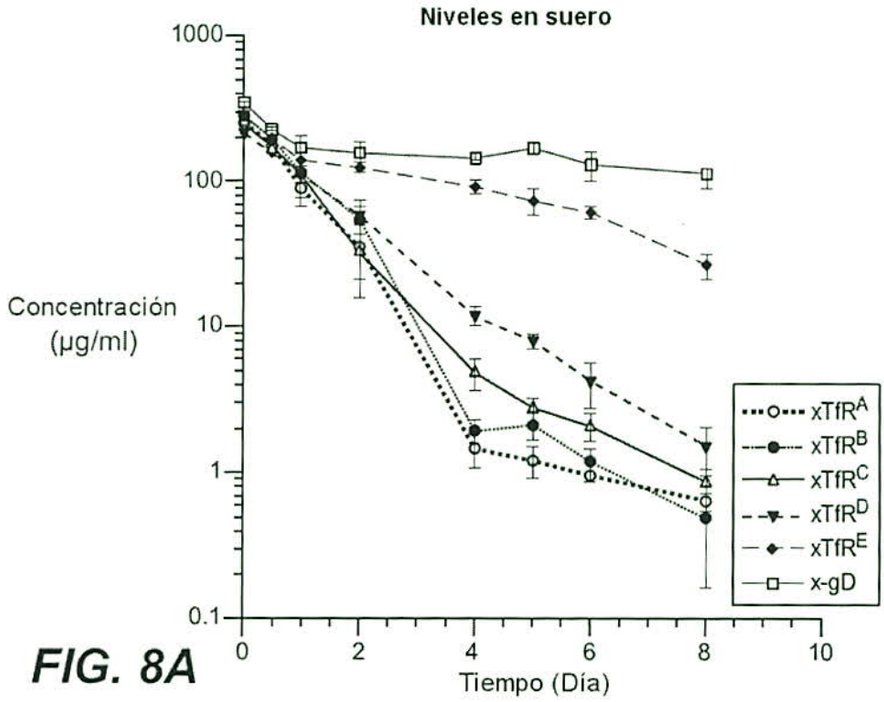

Niveles en suero
1000
100
10
1
0.1
Concentración
(µg/ml)
0
2
4
6
8
10
Tiempo (Día)
xTfR^A
xTfR^B
xTfR^C
xTfR^D
xTfR^E
x-gD

FIG. 8A

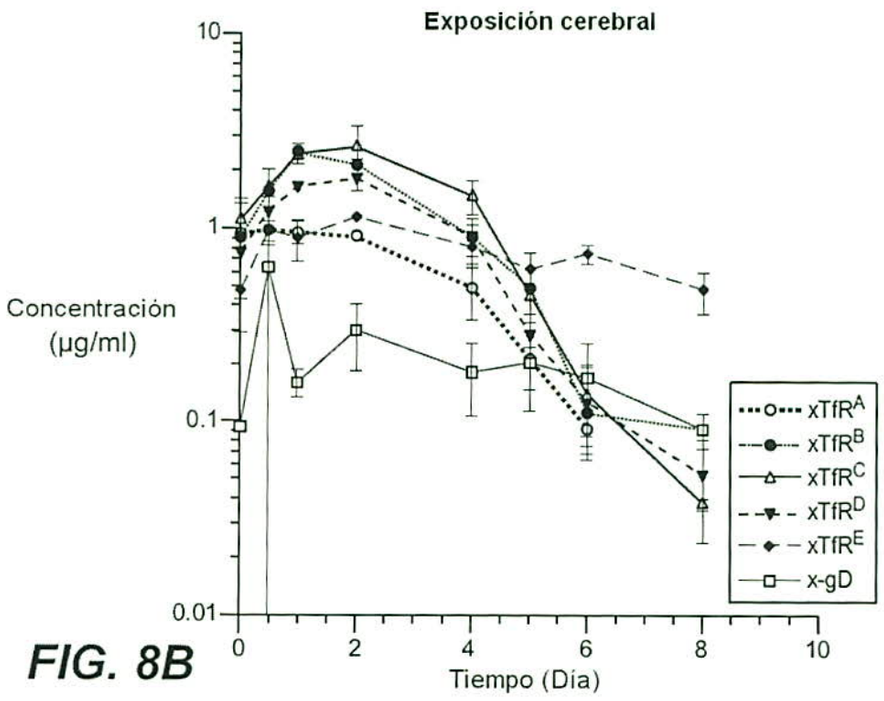

Exposición cerebral
10
1
0.1
0.01
Concentración
(µg/ml)
0
2
4
6
8
10
Tiempo (Día)
xTfR^A
xTfR^B
xTfR^C
xTfR^D
xTfR^E
x-gD

FIG. 8B

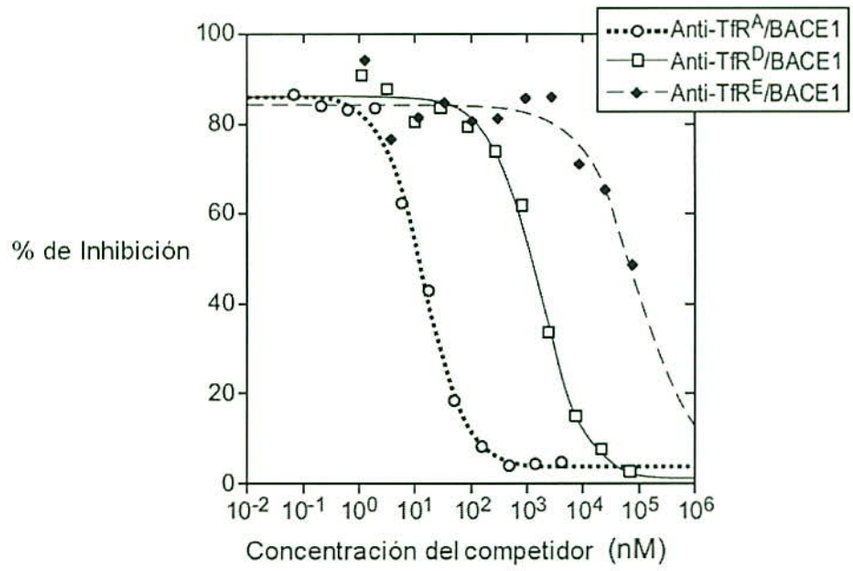

Anti-TfR^A/BACE1
Anti-TfR^D/BACE1
Anti-TfR^E/BACE1
% de Inhibición
100
80
60
40
20
0
10^{-2} 10^{-1} 10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
Concentración del competidor (nM)

FIG. 9A

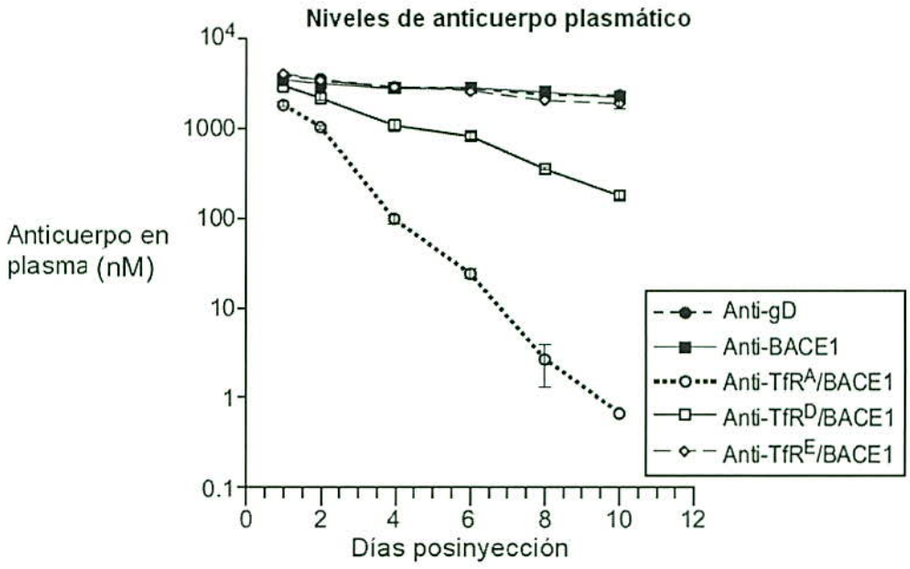

Niveles de anticuerpo plasmático
Anticuerpo en plasma (nM)
10^4
1000
100
10
1
0.1
0 2 4 6 8 10 12
Días posinyección
Anti-gD
Anti-BACE1
Anti-TfR^A/BACE1
Anti-TfR^D/BACE1
Anti-TfR^E/BACE1

FIG. 9B

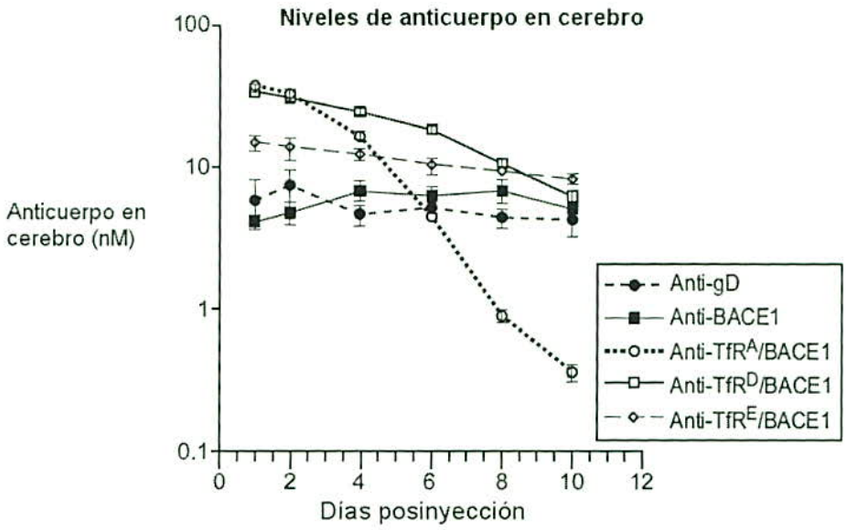

Niveles de anticuerpo en cerebro
Anticuerpo en cerebro (nM)
100
10
1
0.1
0
2
4
6
8
10
12
Días posinyección
Anti-gD
Anti-BACE1
Anti-TfR^A/BACE1
Anti-TfR^D/BACE1
Anti-TfR^E/BACE1

FIG. 9C

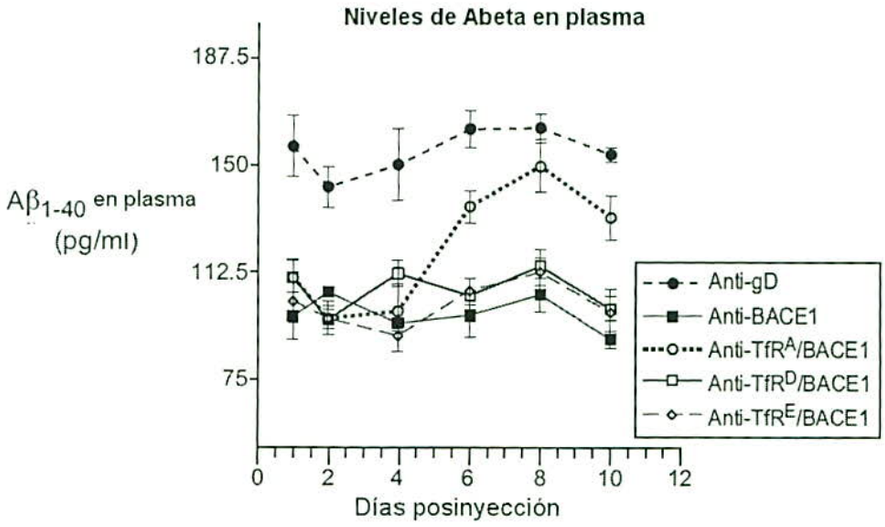

Niveles de Abeta en plasma
Aβ1-40 en plasma (pg/ml)
187.5
150
112.5
75
0
2
4
6
8
10
12
Días posinyección
Anti-gD
Anti-BACE1
Anti-TfR^A/BACE1
Anti-TfR^D/BACE1
Anti-TfR^E/BACE1

FIG. 9D

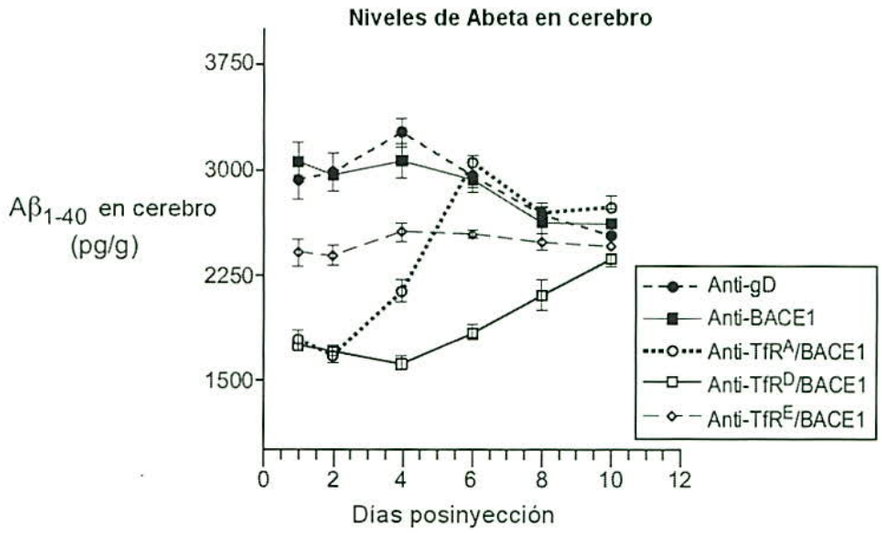


FIG. 9E

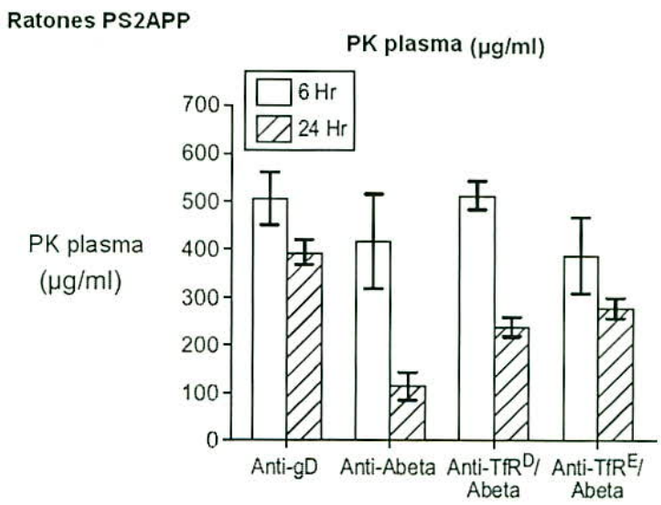


FIG. 10A

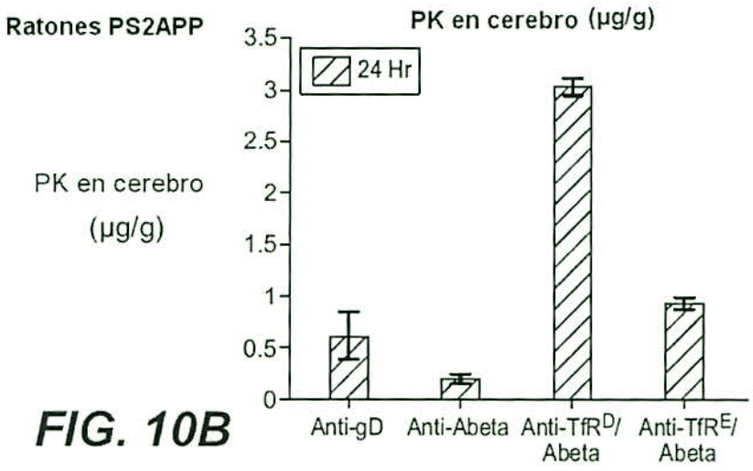


FIG. 10B

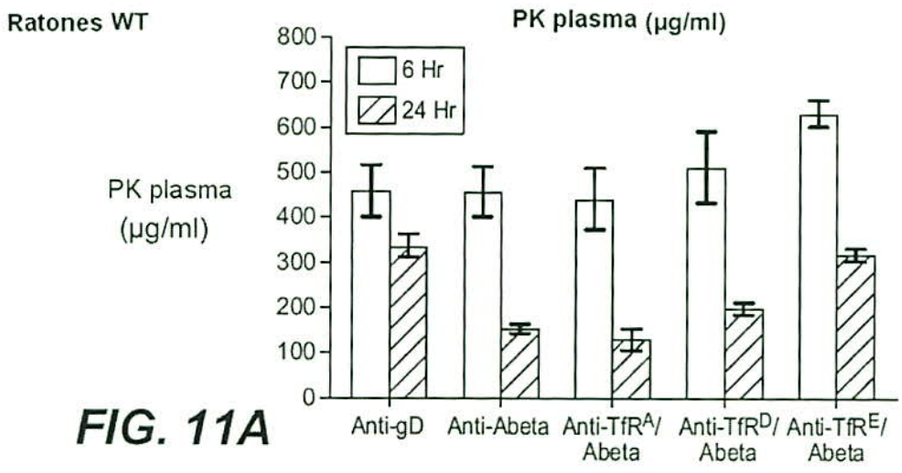


FIG. 11A

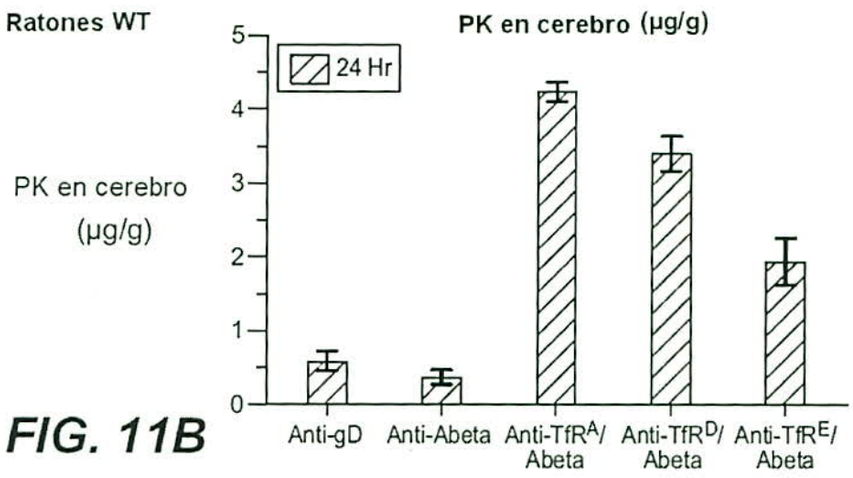

Ratones WT
PK en cerebro (µg/g)
PK en cerebro
(µg/g)
24 Hr
5
4
3
2
1
0
Anti-gD
Anti-Abeta
Anti-TfR^A/ Abeta
Anti-TfR^D/ Abeta
Anti-TfR^E/ Abeta

FIG. 11B

Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC.

<120> ANTICUERPOS PARA EL RECEPTOR DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA DE BAJA AFINIDAD Y SUS USOS

<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 se sintetiza

<400> 1

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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<400> 2

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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<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

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<400> 5
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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<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

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<400> 8
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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<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

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<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
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<400> 12

```
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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<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
```

<210> 14
<211> 438

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<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

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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia se sintetiza

<400> 15
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
```

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**,, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) **Genentech, Inc.**
1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or explotation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **South San Francisco, California USA**

this 6th day of December 2005

Signature

Name Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Title Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.

TO:WENDY M. LEE COMPANY:1 DNA WAY

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 08, 2011

PTAS

501399389

WENDY M. LEE
1 DNA WAY
MS 49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/06/2011 REEL/FRAME: 025598/0289
NUMBER OF PAGES: 6

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR4499

ASSIGNOR:
DENNIS, MARK DOC DATE: 12/02/2010

ASSIGNOR:
WATTS, RYAN JEFFERSON DOC DATE: 12/07/2010

ASSIGNOR:
YU, YUNHUA JOY DOC DATE: 12/07/2010

ASSIGNOR:
ZHANG, YIN DOC DATE: 12/02/2010

TO:WENDY M. LEE COMPANY:1 DNA WAY

025598/0289 PAGE 2

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
MS 49
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 61418223 FILING DATE: 11/30/2010
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: LCW AFFINITY BLOOD BRAIN BARRIER RECEPTOR ANTIBODIES AND USES THEREFOR

OCRUSER, EXAMINER
ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

[redacted]

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Mark Dennis	12/02/2010
Ryan Jefferson Watts	12/07/2010
Yunhua Joy Yu	12/07/2010
Yin Zhang	12/02/2010

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
Internal Address:	MS 49
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	61418223

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650-225-1994
Email: kan@gene.com
Correspondent Name: Wendy M. Lee
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: MS 49
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR4499
NAME OF SUBMITTER:	Wendy M. Lee

RECEIVED 01/25/2011 00:53:36 FC

TO:WENDY M. LEE COMPANY:1 DNA WAY

Total Attachments: 4
source=PR4499Assign#page1.tif
source=PR4499Assign#page2.tif
source=PR4499Assign#page3.tif
source=PR4499Assign#page4.tif

Docket No. PR4499

ASSIGNMENT

WHEREAS, Mark Dennis, a citizen of U.S.A., having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Ryan Jefferson Watts, a citizen of U.S.A.,having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yunhua Joy Yu, a citizen of U.S.A., having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yin Zhang, a citizen of China, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

LOW AFFINITY BLOOD BRAIN BARRIER RECEPTOR ANTIBODIES AND USES THEREFOR

for which a provisional application Serial No. 61/418,223 (Docket No. PR4499) has been filed by them on November 30, 2010; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: 12/2/10

Mark Dennis

South San Francisco

Dated: 12/2/10

Ryan Jefferson Watts

South San Francisco

Dated: _____

Yunhua Joy Yu

South San Francisco

Dated: 12/2/10

Yin Zhang

Docket No. PR4499

ASSIGNMENT

WHEREAS, Mark Dennis, a citizen of U.S.A., having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Ryan Jefferson Watts, a citizen of U.S.A.,having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yunhua Joy Yu, a citizen of U.S.A., having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yin Zhang, a citizen of China, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

LOW AFFINITY BLOOD BRAIN BARRIER RECEPTOR ANTIBODIES AND USES THEREFOR

for which a provisional application Serial No. 61/418,223 (Docket No. PR4499) has been filed by them on November 30, 2010; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

_____
Mark Dennis

South San Francisco

Dated: 12/7/10

_____
Ryan Jefferson Watts

South San Francisco

Dated: 12/7/10

_____
Yunhua Joy Yu

South San Francisco

Dated: _____

_____
Yin Zhang

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A **GENENTECH, INC.**, firmado por los cedentes y el cesionario.

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES ESTADOS UNIDOS
Bajo el Secretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

Enero 09, 2011

PTAS

WENDY M. LEE
1 DNA Way
Ms 49
South San Francisco, CA 94080

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos
Notificación de Registro de Documento de Cesión

El documento anexo ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos. Una copia microfilmada completa se encuentra disponible en la Sala de Búsquedas de Cesiones en el rollo y cuadro cuyo nombre de referencia aparece más adelante.

Por favor revise toda la información que contiene esta notificación. La información contenida refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Marcas y Patentes. Si encuentra errores o tiene preguntas con respecto a este documento, puede contactar al funcionario cuyo nombre aparece en esta notificación, marcando el 571-272-3350. Las solicitudes de corrección se pueden enviar a: U.S. Patent and Trademark Office, Mail Stop: Assignment Services Branch, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313.

Fecha de Registro: 01/06/2011

Rollo/Cuadro: 025598/0289
Número de páginas: 6

Resumen: Cesión de interés del cedente (véase documento para detalles)
Número de Expediente de Abogado: PR4499

Cedente:
DENNIS, MARK — Fecha del documento: 12/02/2010

Cedente:
WATTS, RYAN JEFFERSON — Fecha del documento: 12/07/2010

Cedente:
YU, YUNHUA JOY — Fecha del documento: 12/07/2010

Cedente:
ZHANG, YIN — Fecha del documento: 12/02/2010

Cesionario:
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
Ms 49
South San Francisco, CA 94080

Número de solicitud: 61418223
Número de patente:

Fecha de presentación: 11/30/2010
Fecha de expedición:

Título: ANTICUERPOS PARA EL RECEPTOR DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA DE BAJA AFINIDAD Y SUS USOS

Ocruser, Examinador
SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESIONES
DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de ejecución
Mark Dennis	12/02/2010
Ryan Jefferson Watts	12/07/2010
Yunhua Joy Yu	12/07/2010
Yin Zhang	12/02/2010

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Dirección interna:	MS 49
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080

NÚMERO DE PROPIEDADES Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	61418223

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (650) 952 9881

Teléfono: 650 225 1994

Correo electrónico: kan@gene.com

La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Nombre del destinatario: Wendy Lee

Dirección Línea 1: 1 DNA Way

Dirección Línea 2: MS#49

Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	PR4499
NOMBRE DEL REMITENTE:	Wendy M. Lee

Total anexos:

Fuente= PR4499Assign#page1.tif
Fuente= PR4499Assign#page2.tif
Fuente= PR4499Assign#page3.tif
Fuente= PR4499Assign#page4.tif

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Mark Dennis**, un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Ryan Jefferson Watts,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yunhua Joy Yu,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; y **Yin Zhang**, un ciudadano de China, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (en adelante referidos como "CEDENTES"); han inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPOS PARA EL RECEPTOR DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA DE BAJA AFINIDAD Y SUS USOS

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/418,223 (Expediente de abogado No. PR4499) el 30 de noviembre de 2010; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucran dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucran dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha: 12/02/2010

(firma)
Nombre: Mark Dennis

South San Francisco

Fecha:

Nombre: Ryan Jefferson Watts

South San Francisco

Fecha:

Nombre: Yunhua Joy Yu

South San Francisco

Fecha: 12/02/2010

(firma)
Nombre: Yin Zhang

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Mark Dennis**, un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Ryan Jefferson Watts,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yunhua Joy Yu,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; y **Yin Zhang**, un ciudadano de China, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (en adelante referidos como "CEDENTES"); han inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPOS PARA EL RECEPTOR DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA DE BAJA AFINIDAD Y SUS USOS

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/418,223 (Expediente de abogado No. PR4499) el 30 de noviembre de 2010; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucran dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucran dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha:

_____
Nombre: Mark Dennis

South San Francisco

Fecha: 12/07/2010

_____(firma)_____
Nombre: Ryan Jefferson Watts

South San Francisco

Fecha: 12/07/2010

_____(firma)_____
Nombre: Yunhua Joy Yu

South San Francisco

Fecha:

_____
Nombre: Yin Zhang

124775

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0046830

Bogotá D.C., Mayo 15 de 2013 - 16:51:49

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	426513242	15/05/2013	57.807.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-154248- -00000-0000
Fecha: 2013-06-28 16:40:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139

130
124775

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0054534

Bogotá D.C., Junio 06 de 2013 - 08:23:12

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	426513290	05/06/2013	21.138.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
40	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	1.200.000.00
				$1.200.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N DOSCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-154248- -00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:40:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139

139
124775

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0050408

Bogotá D.C., Mayo 24 de 2013 - 16:28:39

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	562581180	24/05/2013	14.430.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
5	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	150.000.00
				$150.000.00

SON: **CIENTO CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-154248- -00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:40:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-154248- -00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:40:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐