

**ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL RECEPTOR DEL FACTOR 1 DE
CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA Y USOS DE LOS MISMOS**
CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a anticuerpos
específicos del receptor del factor 1 de crecimiento similar
a la insulina, a fragmentos de los mismos y a usos de los
mismos. Más específicamente, la presente invención se refiere
a anticuerpos específicos del receptor del factor similar a
10 la insulina 1 y fragmentos de los mismos que transmigran la
barrera hematoencefálica, y a usos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y
la enfermedad de Parkinson, son una carga cada vez mayor en
nuestra sociedad en envejecimiento, porque actualmente no
existen tratamientos efectivos para estas afecciones
incapacitantes. El tratamiento, así como el diagnóstico
20 precoz de estas y otras enfermedades que se originan en el
cerebro siguen siendo difíciles debido a que la mayoría de
las moléculas y diagnósticos terapéuticos adecuados no puede
penetrar en la apretada y altamente restrictiva barrera
hematoencefálica (BHE) (Abbott, 2013). La BEH constituye una
25 barrera física que está formada por células endoteliales
cerebrales (CEC) que recubren los vasos sanguíneos y se
conectan entre sí a través de las uniones estrechas (Abbott,
2013). Las uniones estrechas formadas entre las CEC son
esenciales para la integridad de la BHE y previenen el
30 transporte paracelular de las moléculas más grandes de 500
daltons (Da). Dado que las células endoteliales cerebrales

presentan tasas muy bajas de pinocitosis (Abbott, 2013), el transporte transcelular de moléculas de mayor tamaño se limita a la ruta de la transcitosis mediada por receptor altamente específico (TMR) y la transcitosis pasiva mediada por adsorción a base de carga (Abbott, 2013; Pardridge, 2002). Adicionalmente, la alta densidad de las bombas de eflujo, tales como la P-glicoproteína o la proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR-1), contribuye a la eliminación de sustancias no deseadas del cerebro (Abbott, 2013).

Si bien todas estas características protegen al cerebro contra los patógenos y toxinas, igualmente impiden la entrada de la mayoría de los fármacos. De hecho, menos del 5 % de las terapéuticas de moléculas pequeñas y prácticamente ninguna de las terapéuticas de mayor tamaño puede atravesar la BHE en concentraciones farmacológicamente relevantes (es decir, suficiente para fijarse a una diana en el sistema nervioso central (SNC) y provocar una respuesta farmacológica / terapéutica) a menos que sean específicamente 'transportadas', es decir, acoplados a una molécula transportadora. Debido a la falta de "vehículos" eficaces para el transporte de moléculas "a través de la BHE, numerosos fármacos contra enfermedades neurodegenerativas se han "almacenado" o eliminado de su posterior desarrollo, ya que no se pueden liberar en el cerebro en cantidad suficiente.

Se han explorado diferentes enfoques para liberar moléculas más grandes en el cerebro. Por ejemplo, la integridad de la BHE puede alterarse, dando como resultado

una BHE con fugas que, a su vez, permite la entrada paracelular sin restricciones de las moléculas más grandes en el cerebro. Las uniones estrechas se pueden aflojar o alterar con éxito mediante diversos enfoques. Por ejemplo, la inyección de sustancias que inducen choque osmótico (por ejemplo, manitol, soluciones hipertónicas) en el torrente sanguíneo provoca la reducción del tamaño de la célula y da lugar a la interrupción de las uniones estrechas, de modo que se compromete gravemente la BHE (Guillaume, 2010). Otros moduladores de las uniones estrechas incluyen alquilgliceroles, bradiquinina y varios análogos de los mismos, así como los virus que modulan la expresión de las proteínas implicadas en el mantenimiento de las uniones estrechas (Erdlenbruch et al., 2003; Preston et al., 2008; Gan et al., 2013). Una interrupción más localizada de la BHE es posible a través de la aplicación de ultrasonidos (Nhan et al., 2013). Sin embargo, los períodos durante los cuales se interrumpe la BHE son suficientes para alterar la homeostasis del cerebro y permitir que los productos químicos dañinos, toxinas y patógenos entren en el cerebro; esto puede dar lugar a efectos secundarios graves, por ejemplo, convulsiones e inflamación cerebral, infección y cambios neuropatológicos posiblemente permanentes. Como sería evidente para los expertos en la técnica, los tratamientos repetidos con estas técnicas para enfermedades crónicas y difusas del cerebro que afectan a múltiples regiones del cerebro no son prácticos. La mayoría de estos tratamientos son costosos, requieren hospitalización, y algunas estrategias requieren anestesia.

Otro abordaje para eludir la BHE es la inyección directa de moléculas terapéuticas en el líquido cefalorraquídeo

(LCR), el espacio del parénquima, u otras partes del cerebro. Se han desarrollado diversos métodos de entrega liberación, incluyendo: administración intracerebral (intraparenquimal), intraventricular e intratecal mediante bombas de infusión o
5 difusión potenciada por convección (DPC). Sin embargo, cualquier tipo de inyección directa en el cerebro o implante intracerebral es un procedimiento invasivo y costoso, ya que requiere hospitalización, anestesia, y, a menudo, cirugía. Por otra parte, las malas tasas de difusión de los agentes
10 terapéuticos, en particular moléculas biológicas grandes, dentro del parénquima cerebral limitan la penetración de agentes terapéuticos a solo pequeñas zonas que rodean el lugar de la inyección / implantación. La colocación correcta de inyecciones, catéteres e implantes es un reto todavía
15 crucial para lograr la difusión del fármaco a la región diana del cerebro. Además, los catéteres y los implantes proporcionan un sitio para la infección y / o la respuesta inmune contra el material extraño.

20 En otro intento de aumentar la liberación a través de la BHE, los fármacos del sistema nervioso central se han modificado para aumentar su absorción en el cerebro. Tales modificaciones pueden incluir un cambio de su carga superficial, una reducción del tamaño de la molécula y un
25 cambio en la lipofilicidad de los fármacos. Sin embargo, también es probable que las modificaciones para aumentar la penetración en el cerebro alteren la farmacología general del fármaco, incluida su actividad y / o especificidad deseadas. Además, las moléculas lipofílicas son más propensas a su
30 exportación desde el cerebro a través de la bomba de eflujo de P-glicoproteína.

Por último, se han explotado los mecanismos de transporte endógenos a través de la BHE. Los mecanismos fisiológicos que permiten el transporte de moléculas grandes a través de la BHE se pueden dividir en las rutas de transcitosis mediada por receptor altamente específico (TMR) y endocitosis mediada por adsorción basada en carga no específica. La endocitosis se activa tras la unión del ligando específico a su receptor o tras la interacción electrostática entre el ligando catiónico o el fármaco y los grupos funcionales aniónicos en la superficie de las células endoteliales del cerebro (lado luminal), respectivamente. Posteriormente, el endosoma recién formado sufre transcitosis a través de la célula al lado abluminal, para liberar su carga.

Dado que la transcitosis mediada adsortiva es una interacción inespecífica mediada por la carga se produce en todos los lechos vasculares y los órganos, lo que limita la disponibilidad del fármaco para su liberación en el cerebro. Por lo tanto, la explotación de la ruta de la TMR sigue siendo el único método de liberación en el cerebro fisiológica, no invasiva pero altamente específico de receptor.

En la actualidad solo se conocen unos pocos receptores que sufren TMR en la BHE y que “navegan” a través de sus ligandos naturales: el receptor bien estudiado de la transferrina (TfR), el receptor de la insulina (IR), las proteínas 1 y 2 relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP-1 and -2), el receptor de la toxina de la difteria y TMEM30A. Los péptidos, ligandos naturales y

anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se han desarrollado que se unen a estos receptores (Pardridge et al., 1991; Yu et al., 2011; Muruganandam et al., 2001; Abulrob et al., 2005; Demeule, 2008; Sumbria et al., 2013), que funcionan como transportadores del fármaco al cerebro que utilizan vías de TMR endógenos. Sin embargo, hasta la fecha solo se ha analizado un único péptido (Angiopep ANG1005, apuntando a LRP-1) en los estudios clínicos de fase I, mientras que se están estudiando otros candidatos en contexto en el contexto de laboratorio. La ruta de TMR parece ser la ruta más prometedora para el transporte de fármacos al cerebro, pero los enfoques actuales tienen limitaciones, entre ellas: la expresión no selectiva del receptor diana en la BHE, la competencia entre el vehículo y los ligandos naturales al receptor, la transcitosis ineficaz de un receptor, así como la degradación lisosomal de los vehículos de endocitosis (Xiao and Gun, 2013).

La falta de vehículos de la BHE de alta capacidad y alta selectividad retrasa el desarrollo de nuevas terapias y diagnósticos para enfermedades que se originan en el cerebro, incluyendo tumores cerebrales y enfermedades neurodegenerativas. Existe claramente una necesidad de un método no invasivo para liberar moléculas terapéuticas y de diagnóstico pequeñas y grandes a dosis farmacológicamente eficaces en el cerebro sin interrumpir la fisiología y la homeostasis de la BHE.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos
específicos del receptor del factor 1 de crecimiento similar
a la insulina (IGF1R) y a usos de los mismos. Más
específicamente, la presente invención se refiere a
5 anticuerpos específicos del receptor del factor similar a la
insulina 1 y fragmentos de los mismos que transmigran la
barrera hematoencefálica, y a usos de los mismos.

La presente invención proporciona anticuerpos aislados o
10 purificados o fragmentos de los mismos que se unen
específicamente a un epítipo del receptor del factor 1 de
crecimiento similar a la insulina (IGF1R), en el que el
anticuerpo o fragmento del mismo transmigre la barrera
hematoencefálica y en el que el epítipo está unido
15 específicamente por el anticuerpo de SEQ ID NO:5. El epítipo
del IGF1R puede estar en el dominio extracelular del IGF1R.

La presente invención proporciona además anticuerpos
aislados o purificados o fragmento de los mismos, que
20 comprende

una secuencia de la región determinante de la
complementariedad (CDR) 1 de GGTVSPTA (SEQ ID NO:1);

una secuencia de CDR2 de ITWSRGTT (SEQ ID NO: 2); y

una secuencia de CDR3 de AASTFLRILPEESAYTY (SEQ ID NO:
25 3),

en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une
específicamente al receptor del factor de crecimiento 1
similar a la insulina (IGF1R).

Por ejemplo, y sin desear ser limitante de ninguna manera, el aislado o purificado o fragmento del mismo específico del IGF1R pueden ser

X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅X₆SGGTVSPTAMGWX₇RQAPGKX₈X₉EX₁₀VX

5 11HITWSRGTTTRX₁₂ASSVKX₁₃RFTISRDX₁₄X₁₅KNTX₁₆YLMNSLX₁₇X₁₈EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT X₁₉VTVSS (SEQ ID NO:4), en la que X₁ es E o Q; X₂ es K o Q; X₃ es V o E; X₄ es A o P; X₅ es A o E; X₆ es V o A; X₇ es V o F; X₈ es G o E; X₉ es L o R; X₁₀ es F o W; X₁₁ es G o S; X₁₂ es V o Y; X₁₃ es D o G; X₁₄ es N o S; X₁₅ es A o S; X₁₆ es L o V; X₁₇ es K o R; X₁₈ es A o S; y X₁₉ es L o Q,

o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En ejemplos más específicos, no limitantes, el anticuerpo aislado o purificado puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

15 VKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFEVGHITWSRGTRVASSVKDRFTISRDSAKNTVYLMNSLKSEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5), denominada en el presente documento IGF1R-4;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWRQAPGKGLEWVGHITWSRG
20 TTRYASSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT
TLVTVSS (SEQ ID NO:6), denominada en el presente documento IGF1R-4_H2;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRG
TTRYASSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT
25 TLVTVSS (SEQ ID NO:7), denominada en el presente documento IGF1R-4_H3;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRG
TTRYASSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT
TLVTVSS (SEQ ID NO:8), denominada en el presente documento
30 IGF1R-4_H4;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRG
 TTRYASSVKGRFTISRDSKNTVYLMNSLR AEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
 TLVTVSS (SEQ ID NO:9), denominada en el presente documento
 IGF1R-4_H5; y

5 o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo
 como se ha descrito anteriormente puede ser un anticuerpo de
 dominio único (Acdu); el Acdu puede ser de origen de
 camélido.

10

El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo
 de la presente invención pueden estar presentes en un formato
 de presentación multivalente. En un formato de presentación
 multivalente, el anticuerpo o fragmento del mismo puede estar
 15 ligado a un fragmento Fc; el fragmento Fc es el Fc2b de ratón
 o Fc1 humano. Por ejemplo, y sin desear ser limitante de
 ninguna manera, el anticuerpo aislado o purificado o
 fragmento del mismo en presentación multivalente puede
 comprender la secuencia de SEQ ID NO: 10 (denominada en el
 20 presente documento fusión consenso-Fc de IGF1R-4), SEQ ID NO:
 39 (denominada en el presente documento Fc-consenso de IGF1
 R-4) u 11 (denominada en el presente documento fusión IGF1 R-
 4-Fc).

25 El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo
 como se describe en el presente documento puede transmigrar
 la barrera hematoencefálica.

La presente invención también proporciona una molécula
 30 de ácido nucleico que codifica el anticuerpo aislado o
 purificado o fragmento del mismo como se describe en el

presente documento. También se proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico tal como se acaba de describir.

5 El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo como se describe en el presente documento puede estar inmovilizado sobre una superficie.

La presente invención proporciona además el anticuerpo
10 aislado o purificado o fragmento del mismo como se describe en el presente documento unido a una molécula de carga; la molécula de carga puede tener un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 200 kDa. La molécula de carga unida al anticuerpo o fragmento del
15 mismo puede ser un agente detectable, un agente terapéutico, un fármaco, un péptido, un factor de crecimiento, una citocina, una trampa de receptor, un compuesto químico, un resto de hidrato de carbono, una enzima, un anticuerpo o fragmentos del mismo, una molécula basada en ADN, un vector
20 viral, o un agente citotóxico; uno o más liposomas o nanovehículos cargados con un agente detectable, un agente terapéutico, un fármaco, un péptido, una enzima, y un anticuerpo o fragmentos del mismo, una molécula basada en ADN, un vector viral, o un agente citotóxico; o uno o más de
25 nanopartículas, nanohilos, nanotubos, o puntos cuánticos.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición que comprende uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo como se describe en el
30 presente documento y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona un método *in vitro* de detección del IGF1R, comprendiendo el método

a) poner en contacto una muestra de tejido con uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo como se describe en el presente documento unido a un agente detectable; y

b) detectar el agente detectable que detecta el agente detectable unido al anticuerpo o fragmento del mismo unido a IGF1R en la muestra de tejido.

En el método descrito anteriormente, la muestra puede ser una muestra de suero, una muestra de tejido vascular, una muestra de tejido tumoral o una muestra de tejido cerebral de un sujeto humano o animal. En el método tal como se describe, la etapa de detección (etapa b)) se puede realizar usando formación de imágenes ópticas, inmunohistoquímica, imágenes de diagnóstico molecular, ELISA, s espectrometría de masas acoplada a formación de imágenes o cualquier otro método adecuado.

También se proporciona un método *in vivo* para detectar la expresión de IGF1R en un sujeto, comprendiendo el método:

a) la administración al sujeto de uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo como se describe en el presente documento unido a un agente detectable; y

b) detectar el agente detectable unido al anticuerpo o fragmento del mismo unido a IGF1R.

En el método descrito anteriormente, la etapa de detección (etapa b)) se puede realizar usando PET (tomografía

por emisión de positrones), SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único), imágenes de fluorescencia o cualquier otro método adecuado.

5 Actualmente se proporciona un método de transporte de una molécula de interés a través de la barrera hematoencefálica (BHE), comprendiendo el método:

 a) la administración a un sujeto de uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo como se
10 describe en el presente documento unido a la molécula de interés, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo transmigra la barrera hematoencefálica,

 en el que el uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo transporta la molécula de interés a través de la BHE.
15 En el método que se acaba de describir, la molécula de interés puede tener un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 200 kDa; la molécula de interés puede ser un agente detectable, un agente terapéutico, un fármaco, un péptido, un factor de
20 crecimiento, una citocina, una trampa de receptor, un compuesto químico, un resto de hidrato de carbono, una enzima, un anticuerpo o fragmento del mismo, una molécula basada en ADN, un vector viral, o un agente citotóxico; uno o más liposomas o nanovehículos cargados con un agente
25 detectable, un agente terapéutico, un fármaco, un péptido, una enzima, un anticuerpo o fragmento del mismo, un agente citotóxico; o uno o más de nanopartículas, nanohilos, nanotubos, o puntos cuánticos. En el método como se describe en el presente documento, la administración puede ser
30 intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.).

La invención también abarca un método de cuantificación de una cantidad de una molécula de carga liberada través de la BHE de un sujeto, en el que la molécula de carga está unida a uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o
5 fragmento del mismo como se describe en el presente documento, comprendiendo el método

a) obtener el líquido cefalorraquídeo (LCR) del sujeto; y

b) usar métodos de proteómica dirigida a cuantificar
10 la cantidad de la molécula de carga unida a uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo en el LCR.

La molécula de carga puede ser cualquier molécula
15 deseada, incluyendo las moléculas de carga descritas anteriormente; el anticuerpo o fragmento del mismo transmigra la BHE; y la molécula puede estar "unida" al anticuerpo o fragmento del mismo, como se ha descrito anteriormente. En el método anterior, el LCR se obtiene de un sujeto usando
20 cualquier método adecuado conocido en la técnica. La cantidad de LCR requerida para el método de proteómica dirigida en la etapa b) puede estar entre aproximadamente 1 a 10 µl. Los métodos de proteómica dirigida usados para cuantificar la cantidad del uno o más de anticuerpo o fragmento del mismo
25 unido a la molécula de carga puede ser cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, el método de proteómica dirigida puede ser un método de espectrometría de masas, tal como la monitorización de reacción múltiple - patrones internos marcados con isotipo
30 marcada (RMR - SIIT)

La mala liberación de agentes diagnósticos o fármacos a través de la estrecha y selectiva BHE compromete el desarrollo de tratamientos para enfermedades cerebrales, tales como, pero sin limitaciones, tumores cerebrales y enfermedades neurodegenerativas. La falta de vehículos para el transporte de moléculas a través de la BHE retrasa el desarrollo de nuevas terapias y diagnósticos para tales enfermedades. Como se describe en el presente documento se ha producido una V_HH de unión al IGF1R que proporciona una plataforma de transporte eficaz para la liberación de fármacos conjugados con el anticuerpo a través de la BHE en sus dianas en el cerebro. El anticuerpo descrito en el presente documento explota la vía de TMR natural del IGF1R desde el lado luminal al lado abluminal de las células endoteliales del cerebro que conforman la BHE. Después de la unión del anticuerpo al IGF1R, la TMR se inicia y el anticuerpo, junto con una molécula conjugada (de carga), sufre transcitosis a través de la célula al lado abluminal, en el que ambos se liberan en el microentorno cerebral. Se confirmó que el anti-IGF1R V_HH se unía al IGF1R (Fig. 3C), se internaliza en las células de la BHE (Fig. 4), y cruzan al lado abluminal del modelo de BHE *in vitro* (Fig. 6B). Los estudios de liberación del fármaco en el cerebro *in vivo* también mostraron que la V_HH del IGF1R “portaba” un péptido conjugado (galanina; aproximadamente 3kDa), así como una fusión de proteína grande (aproximadamente 80 kDa) a través de la BHE (Fig. 9A y B; Fig. 9C).

Los resultados también muestran que el VHH anti-IGF1R puede expresarse en fusión con el fragmento Fc (fragmento cristalizante) para prolongar la semivida en circulación en

aproximadamente 75 veces (aproximadamente 25 horas en comparación con aproximadamente 20 minutos para V_HH solo). Esta construcción de fusión de alto peso molecular (aproximadamente 80 kDa) también se transporta de manera
5 eficiente a través de la BHE. La larga semivida en plasma aumenta la exposición al LCR de VHH-mFc del IGF1R (mFc = Fc de ratón) conjugado significativamente en comparación con solo el V_HH y es útil como vehículo de liberación en la BHE para el tratamiento de enfermedades crónicas con dianas en el
10 SNC. El conjugado se detecta fácilmente en el parénquima cerebral, usando detección de inmunofluorescencia. Los resultados demuestran que el vehículo de V_HH del IGF1R puede "transportar" moléculas grandes (de tamaño similar a: anticuerpos, enzimas, factores de crecimiento, péptidos,
15 citoquinas, trampas de receptores) a través de la BHE.

Por lo tanto, la liberación del anticuerpo no solo puede ser útil para el tratamiento a corto plazo (por ejemplo, convulsiones epilépticas), pero también puede ser útil para
20 los tratamientos a medio plazo (por ejemplo, cáncer) y a largo plazo (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o Parkinson).

Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención
25 serán evidentes a la vista de la descripción siguiente. Las descripciones y ejemplos detallados, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán
30 evidentes para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Estas y otras características de la invención se describirán a continuación a modo de ejemplo, con referencia
5 a los dibujos adjuntos, en los que:

La FIGURA 1 es un diagrama esquemático del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R). El IGF1R se encuentra en la superficie celular y comprende dos
10 subunidades: la subunidad alfa y la subunidad beta. La subunidad alfa (que comprende una parte extracelular con el sitio de unión al factor de crecimiento 1 similar a la insulina) está conectada por un enlace disulfuro a la subunidad beta (que comprende un pequeño dominio
15 extracelular, una región transmembrana y una porción intracelular). El receptor de IGF1 puede formar un dímero. Un fragmento de 933 aminoácidos de longitud que comprende la subunidad alfa y la porción extracelular de la subunidad beta, como se indica en el recuadro gris, (M1 - F933,
20 SwissProt n.º de acceso P08069; véase la figura 2) se produjo de forma recombinante y se usó para la inmunización de una llama.

La Figura 2 muestra la secuencia de IGF1R (SwissProt N.º
25 de Acceso P08069). El fragmento de la proteína de 933 aminoácidos de longitud utilizado para la inmunización y la fijación muestra en negrita; el ectodominio completo es 2 aminoácidos más largo. El sitio de escisión de la furina, que separa las subunidades alfa y beta, se muestra en letra
30 minúscula en cursiva. El péptido señal se muestra en negrita y cursiva.

La Figura 3A muestra un cromatograma de exclusión por tamaño de la unión de V_HH IGF1R-4 al IGF1R y sus variantes humanizadas (H1, H2, H3, H4, H5, H6) a través de una columna Superdex 75. El perfil sugiere que todos estos V_HH a excepción de IGF1R H1 son monoméricos y no agregantes. La Figura 3B muestra la temperatura de fusión (T_f) según se determina mediante dicroísmo circular (CD) para IGF1R-4 V_HH y sus variantes humanizadas (H2, H3, H4, H5, H6). Las proteínas se calentaron por encima de 90 °C y las mediciones se tomaron en el instrumento CD para determinar la curva de fusión (curva superior) y la T_f . Posteriormente, las proteínas se enfriaron hasta la temperatura ambiente, se calentaron una vez más y se analizaron mediante CD (curva inferior para IGF1R-4 V_HH; línea o puntos alrededor de 0 % replegados para las variantes humanizadas). Esto permitió la determinación de la fracción de la fracción de la proteína replegada, que fue cero para las versiones humanizadas y 80 % para IGF1R-4. La Figura 3C muestra una superposición de sensograma de resonancia de plasmón superficial (SPR) para la unión de IGF1R-4 V_HH 0,1 – 5 nM y sus variantes humanizadas (H2, H3, H4, H5, H6) a la porción extracelular recombinante del fragmento del IGF1R humano. Los datos se ajustan bien a un modelo 1:1. La Figura 3D muestra sensogramas de SPR de IGF1 R-4 V_HH que se unen a la porción extracelular recombinante del fragmento de IGF1 R humano en presencia de IGF1. El IGF1 multiplicado 100 no afectó a la unión de IGF1R-4 V_HH, lo que muestra que ambos se unen a diferentes epítomos en el receptor. La Figura 3E muestra que IGF1R-4 V_HH no se unía a la porción extracelular recombinante del receptor de la insulina humana (IR) inmovilizado en la superficie de SPR,

mientras que se unía a la superficie de control del IGF1R humano.

La Figura 4 muestra resultados de imagen de la captación celular de IGF1R-4 V_HH marcado con Cy-5,5 y de V_HH control. IGF1R-4 V_HH marcado con Cy5.5 (o FC5 V_HH como control positivo; Muruganandam et al., 2002; Haqqani et al., 2012) se incubaron con células endoteliales de cerebro de rata inmortalizadas SV40 (svARBEC) a 4 °C (paneles superiores) o a 37 °C (paneles inferiores) para evaluar si IGF1 R-4 se internaba de forma pasiva (4 °C) o a través de mecanismos activos (37 °C), tal como endocitosis mediada por receptor. La cotinción con aglutinina de germen de trigo y DAPI se llevó a cabo para visualizar la superficie celular y el núcleo, respectivamente. Panel superior: Cuando se incubaron a 4 °C, se encontró IGF1 R-4 y FC5 V_HH fuera de las células (puntas de flecha), unidos a la membrana celular (colocalizados con la aglutinina de germen de trigo). Panel inferior: a 37°C tanto FC5 como IGF1R 4-V_HH se acumuló dentro de las células en estructuras de tipo vesícula (puntas de flecha), probablemente endosomas, lo que sugiere la internalización a través de un mecanismo de transporte activo.

La Figura 5A muestra la secuencia para la fusión en C-terminal de IGF1R-4 V_HH con el fragmento Fc murino (IGF1R-4-mFc). Una representación esquemática de la proteína de fusión ensamblada se muestra en la Figura 5B. El IGF1R-4 V_HH se muestra negro y el Fc murino (CH2 y CH3) se muestra en gris en la Figura 5A y B.

La Figura 6A es un diagrama de flujo que resume el uso del modelo de BHE *in vitro* para evaluar la capacidad de diversos V_HH para cruzar la BHE. Cantidades equimolares (5,6 μ M o 1,25 μ M) de V_HH control positivo (FC5) y negativo (A20.1, una toxina A de *Clostridium difficile* que se une a V_HH, y EG2, un V_HH que se une a EGFR) V_HH e IGF1R-4 se analizaron simultáneamente por su capacidad para cruzar la BHE en un modelo de rata *in vitro*. Las células endoteliales cerebrales inmortalizadas SV40 de rata adulta (svARBEC) se cultivan en una monocapa sobre la membrana de un inserto en presencia de medio acondicionado para astrocitos de rata en la cámara inferior y medio estándar en la cámara superior. Después de la adición conjunta de cantidades equimolares de los diversos V_HH a la cara luminal del modelo de BHE, se tomaron muestras de la cámara inferior después de 15, 30, y 60 minutos. Las concentraciones de cada V_HH se cuantificaron mediante espectrometría de masas (monitorización de reacción múltiple - patrones internos marcados con isotipo marcado; MRM-ILIS) en estas muestras. El valor P_{app} [Q_r/dt = cantidad acumulada en el compartimiento receptor en función del tiempo; A = área de la monocapa celular; C₀ = concentración inicial de la solución de dosificación] se utiliza habitualmente para determinar la capacidad de una molécula para cruzar la BHE. La Figura 6B muestra los valores de P_{app} de los cuatro V_HH coadministrados. El IGF1R-4 V_HH tiene un valor P_{app} significativamente mayor que FC5, mientras que ambos controles negativos tienen valores de P_{app} muy bajos, lo que indica un transporte facilitado de FC5 y IGF1R-4 V_HH en comparación con el transporte inespecífico muy bajo o el transporte paracelular de V_HH de control. La Figura 6C muestra los valores de P_{app} de los anticuerpos humanizados de

u solo dominio de IGF1R-4 (H2, H3, H4, H5, H6) (barras
 negras) en comparación con A20.1 V_HH (barras grises), que se
 analizó como control en el mismo pocillo (el valor promedio
 de A20.1 se indica mediante una línea de puntos de color
 5 gris). El resultado indica claramente que simplemente la
 unión de IGF1R (como se ve para la variante 6 humanizada
 (H6)) no es suficiente para desencadenar la trans migración de
 la BHE. La Figura 6D muestra los valores de P_{app} de la fusión
 en C-terminal de IGF1R-4 V_HH a Fc de ratón (negro), en
 10 comparación con el Fc de ratón A20.1 (A20.1mFc) (gris), que
 se analizó en el mismo pocillo y tiene un valor de P_{app} muy
 bajo. IGF1R-4-mFc tiene un valor P_{app} significativamente mayor
 que FC5-mFc (típicamente aproximadamente 180 cm / min, según
 lo indicado por la línea de puntos de color gris). Otra V_HH
 15 de unión a IGF1R, el IGF1 R-1 en fusión con Fc tiene un valor
 P_{app} solo marginalmente mayor que el A20.1 V_HH de control
 interno negativo. Este resultado también demuestra que no
 todos los anticuerpos que se unen a IGF1R trans migran la BHE.
 Los datos muestran además que IGF1R-4-mFc tiene una tasa de
 20 transporte alta similar a través de la BHE en comparación con
 IGF1R-4 V_HH monovalente. Los resultados son los valores
 promedio de P_{app} obtenidos en 3-6 experimentos independientes.
 Los valores promedio de P_{app} de FC5 (V_HH) y A20.1 (V_HH)
 también se indican mediante líneas de puntos para la
 25 comparación.

La figura 7 (paneles superiores) muestra imágenes de
 cuerpo entero in vivo de ratones CD-1 a los que se ha
 inyectado por vía intravenosa PBS (sin tratamiento previo) o
 30 2,5 mg / kg de Cy5.5-IGF1R-4 V_HH o Cy5.5-A20.1 V_HH (el esquema
 de las moléculas inyectadas se muestra en la parte superior)

y escaneado en eXplore Optix el dominio del tiempo de imágenes óptico 30 min después de la inyección. Los paneles inferiores muestran imágenes ex-vivo del cerebro de los mismos animales obtenidas 1 hora después de la inyección de V_HH y después de la perfusión transcardial para eliminar los anticuerpos de la circulación. Las flechas indican la señal óptica alta (gris claro) del trazador fluorescente en la cabeza y en el cerebro ex-vivo en el animal inyectado con Cy5.5-IGF1R-4, mientras que no se puede detectar en el animal inyectado con Cy5.5- A20.1 de control (negro).

La figura 8A muestra el esquema para la síntesis química del conjugado IGF1 R-4 V_HH-galanina. El IGF1R-4 se conjugó primero al grupo NHS de un reticulador sulfo-SMCC (1); después, IGF1R-4-sulfo-SMCC activado por maleimida se conjugó con la cisteína de galanina reducida (2). La Figura 8B muestra un gel de SDS-PAGE de IGF1R-4 (carril 2), IGF1R-4-SMCC (carril 3) y el conjugado IGF1R-4-galanina (carril 4). El patrón de "bandas" indica la unión de 1-2 moléculas de galanina por IGF1 R-4. Los mismos métodos de conjugación se utilizaron para unir galanina con IGF1R-mFc.

La Figura 9 muestra la liberación en el cerebro mediada por IGF1R-4 del péptido conjugado químicamente galanina. La Figura 9A es un gráfico que muestra la capacidad de IGF1R-4 para liberar dosis farmacológicamente eficaces del péptido analgésico galanina (3,2 kD) en el cerebro usando el modelo de dolor de Hargraeves. En este modelo, se induce dolor crónico localizado en ratas Wistar machos (4-6 semanas de edad), mediante la inyección de 100 µl de adyuvante completo de Freund (CFA) en la superficie plantar izquierda,

produciendo una inflamación local en unas horas. Después de la inyección en la vena de la cola del conjugado V_HH-fármaco vehículo de la BHE o galanina solo, las ratas se colocan en recintos de plexiglás sobre una superficie de vidrio. Se enfocó un estímulo térmico sobre la pata inflamada o la contralateral a través de un espejo en ángulo. La latencia entre la aplicación del estímulo y la retirada de la pata (lamido o movimiento de la pata) se interpreta como una medida del efecto analgésico (inhibición de la hiperalgesia térmica). El péptido galanina por sí solo no puede penetrar en la BHE, como se demuestra por la falta de efecto analgésico después de la inyección sistémica (vena de la cola) de 1 mg / kg de galanina (triángulos sólidos negros). La inyección sistémica del conjugado IGF1R-4-galanina (3 mg / kg) inhibe la hiperalgesia térmica, alcanzando una inversión máxima 30 minutos después de la administración (círculos negros sólidos); el efecto fue más pronunciado que el observado con los 6 mg / kg del conjugado de FC5-galanina (cuadrados blancos abiertos). La Figura 9B muestra estos resultados como el área bajo la curva (AUC) de la respuesta en comparación con el efecto máximo posible (MPE; pata control). La figura 9C muestra la inhibición de la hiperalgesia térmica dependiente de la dosis (2 mg/kg y 5 mg/kg) en el modelo de Hargreaves de dolor inflamatorio con el conjugado de IGF1R-4-mFc-galanina administrado i.v. Por el contrario, A20.1-MFC-galanina (5 mg / kg) no indujo ninguna reversión de la hiperalgesia térmica. La figura 9D muestra el porcentaje de inversión de la hiperalgesia térmica (Emax) en el pico de la respuesta obtenida con varias dosis de A20.1-mFc-galanina y IGF1R-4-mFc-galanina.

La Figura 10 muestra los niveles en plasma y LCR de IGF1 R-4, y V_HH, control 'positivo', FC5 y V_HH A20.1 control "negativo" 30 minutos después de la coadministración sistémica (vena de la cola) de 6 mg / kg de cada anticuerpo

5 El LCR se obtuvo de la cisterna magna. Los niveles en plasma y en LCR de IGF1R-4, FC5 y A20.1 se determinaron utilizando el método de MRM-ILIS que "rastrea" y cuantifica las firmas de péptidos proteicos específicos. Los niveles de albúmina en el LCR se determinaron simultáneamente por MRM. Todas las

10 muestras de LCR que tienen una relación en plasma / LCR menor de 1.500 fueron excluidas como potencialmente contaminadas con sangre. La relación de plasma / LCR para IGF1R-4 fue de 1,2 % en comparación con el 0,9% para FC5 y 0,017% para A20.1.

15

La Figura 11 muestra inmunodetección de IGF1R-4mFc en secciones de cerebro 24 horas después de la administración en la vena de la cola de una dosis de 6 mg / kg. Se llevó a cabo perfusión de sacrificio con PBS en las ratas y se obtuvieron

20 secciones de cerebro (12 µm) utilizando el vibratomo. Se inmunodetectó IGF1R-4mFc utilizando un anticuerpo anti-Fc de ratón (rojo; canal rojo solamente mostrado en las inserciones). Los vasos sanguíneos en la sección del cerebro (giro dentado, A; corteza frontal, B) se detectaron

25 utilizando RCA1 lectina (verde). Se pudo detectar IGF1R-4mFc en ambos vasos y fuera de los vasos (es decir, en el parénquima cerebral, transmigrado a través de la BHE) como indican las puntas de flecha.

30

La Figura 12 muestra que IGF1R-4 no interfiere con la insulina o IGF-1 de señalización a través del receptor de la

insulina o IGF1R. La Figura 12A es una transferencia de tipo Western representativa que muestra que ni IGF1R-4, ni ninguno de los demás anti-IGF1R V_HH analizados (IGF1R-1, -3, -5 o -6) induce la fosforilación de Akt aguas abajo solo a una concentración de 100 nM. Tampoco la presencia de 100 nM de IGF1R-4, o cualquiera de los otros V_HH anti-IGF1R inhiben la fosforilación de Akt inducida por 10 µg / ml de insulina. La cuantificación de las densidades de la banda de transferencia de tipo Western de 3 experimentos independientes se muestra en el gráfico de barras (promedio +/- SD) debajo de la imagen del gel. La Figura 12B es una transferencia de tipo Western representativa que muestra que ni IGF1R-4, ni ninguno de los demás V_HH anti-IGF1R analizados (IGF1R -4, -5 o -6) a 100 nM induce la fosforilación de Akt por sí solos ni inhiben la fosforilación de Akt inducida por IGF-1 (es decir, señalización) inducida por la estimulación con 200 ng / ml de IGF-1. La cuantificación de las densidades de las bandas de transferencia de tipo Western de 3 experimentos independientes se muestra en el gráfico de barras (promedio +/- SD) debajo de la imagen del gel. La figura 12C muestra transferencias de tipo Western en sondas para IGF1R fosforilado. Las células se incubaron con 100 nM o 500 nM de IGF1R-4-mFc, o cualquiera de las otras fusiones anti-IGF1R V_HH-mFc (IGF1R-1, -3, or -4 -mFc) solos o estimulados con 200 ng / ml de IGF-1 en presencia de las respectivas proteínas de fusión IGF1R-V_HH-mFc. Las transferencias de tipo Western indican que ninguna de las construcciones de fusión inhibe la fosforilación de IGF1R inducida por y IGF-1 ni la fosforilación del receptor inducida por sí solas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos
5 específicos del receptor del factor 1 de crecimiento similar
a la insulina, a fragmentos de los mismos y a usos de los
mismos. Más específicamente, la presente invención se refiere
a anticuerpos específicos del receptor del factor similar a
la insulina 1 o fragmentos de los mismos que transmigran la
10 barrera hematoencefálica, y a usos de los mismos.

La presente invención proporciona anticuerpos aislados o
purificados o fragmentos de los mismos que se unen
específicamente a un epítipo del receptor del factor 1 de
15 crecimiento similar a la insulina (IGF1R), en el que el
anticuerpo o fragmento del mismo transmigra la barrera
hematoencefálica y en el que el epítipo está unido
específicamente por el anticuerpo de SEQ ID NO:5. El epítipo
del IGF1R puede estar en el dominio extracelular del IGF1R.

20

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado
o purificado o fragmento del mismo, que comprende

una secuencia de la región determinante de la
complementariedad (CDR) 1 de GGTVSPTA (SEQ ID NO:1);

25 una secuencia de CDR2 de ITWSRGTT (SEQ ID NO: 2); y

una secuencia de CDR3 de AASTFLRILPEESAYTY (SEQ ID NO:
3),

en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une
específicamente al receptor del factor de crecimiento 1
30 similar a la insulina (IGF1R).

El término "anticuerpo", también denominado en la técnica "inmunoglobulina" (Ig), como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína construida a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras emparejadas; existen
5 varios isotipos de Ig, incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cuando un anticuerpo se pliega correctamente, cada cadena se pliega en una serie de dominios globulares distintos unidos por secuencias polipeptídicas más lineales. Por ejemplo, la cadena ligera de la inmunoglobulina se pliega en un dominio
10 variable (V_L) y un dominio constante (C_L), mientras que la cadena pesada se pliega en un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_H , C_{H2} , C_{H3}). La interacción de los dominios variables de las cadena pesada y ligera (V_H y V_L) da como resultado la formación de una región de unión al
15 antígeno (Fv). Cada dominio tiene una estructura bien establecida familiar para los expertos en la técnica.

Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son responsables de la unión al antígeno diana y, por lo
20 tanto, pueden mostrar una diversidad de secuencia significativa entre los anticuerpos. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencias y son responsables de la unión de un número de proteínas naturales para provocar importantes acontecimientos bioquímicos. La región variable
25 de un anticuerpo contiene los determinantes de unión a antígeno de la molécula, y, por lo tanto, determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La mayor parte de la variabilidad de secuencia se produce en seis regiones hipervariables, tres cada uno por región
30 variable de la cadena pesada (V_H) y la cadena ligera (V_L); las regiones hipervariables se combinan para formar el sitio de

unión al antígeno y contribuyen a la unión y el reconocimiento de un determinante antigénico. La especificidad y la afinidad de un anticuerpo por su antígeno están determinadas por la estructura de las regiones hipervariables, así como por el tamaño, forma, y química de la superficie que presentan al antígeno. Existen varios esquemas para la identificación de las regiones de hipervariabilidad, siendo los dos más habituales los de Kabat y Chothia y Lesk. Kabat et al (1991) definen las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) según la variabilidad de la secuencia en las regiones de unión a antígeno de los dominios V_H y V_L . Chothia y Lesk (1987) definen los "bucles hipervariables" (H o L) sobre la base de la ubicación de las regiones de bucle estructurales en los dominios V_H y V_L . Dado que estos esquemas individuales definen las CDR y las regiones de bucle hipervariables que son adyacentes o se superponen, los expertos en la técnica de anticuerpos a menudo utilizan los términos "CDR" y "bucle hipervariable" de manera intercambiable y que así se pueden usar en el presente documento. Las CDR / bucles se denominan en el presente documento de acuerdo con el sistema más reciente de numeración IMGT (Lefranc, M.-P. et al., 2003), que se desarrolló para facilitar la comparación de los dominios variables. En este sistema, los aminoácidos conservados (tales como Cys23, Trp41, Cys104, Phe / Trp118, y un residuo hidrofóbico en la posición 89) tienen siempre la misma posición. Además, se proporciona una delimitación estandarizada de las regiones marco (FR1: posiciones 1 a 26; FR2: 39 a 55; FR3: 66 a 104; y FR4: 118 a 129) y de la CDR (CDR1: 27 a 38, CDR2: 56 a 65; y CDR3: 105 a 117).

Un "fragmento de anticuerpo" tal como se refiere en el presente documento puede incluir cualquier fragmento de anticuerpo de unión a antígeno adecuado conocido en la técnica. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo de origen natural, o puede obtenerse mediante manipulación de un anticuerpo de origen natural o mediante el uso de métodos recombinantes. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede incluir, pero no se limita a los mismos, un Fv, Fv de cadena sencilla (scFv; una molécula que consiste en V_L y V_H conectadas con un enlazador peptídico), Fab, $F(ab')_2$, anticuerpo de dominio único (Acdu; un fragmento compuesto por una sola V_L o V_H) y presentaciones multivalentes de cualquiera de estos. Los fragmentos de anticuerpos tales como los que se acaban de describir pueden requerir secuencias enlazadoras, enlaces disulfuro, u otro tipo de enlace covalente para unir diferentes partes de los fragmentos; los expertos en la técnica estarán familiarizados con los requisitos de los diferentes tipos de fragmentos y diversos abordajes y diversos abordajes para su construcción.

20

En un ejemplo no limitante, el fragmento de anticuerpo puede ser un Acdu derivado de fuentes de origen natural. Los anticuerpos de cadena pesada de camélido (Hamers-Casterman et al, 1993) carecen de cadenas ligeras y, por lo tanto, sus sitios de unión de antígeno consisten en un dominio, denominado V_{HH} . Los Acdu también se han observado en tiburones y se denominan V_{NAR} (Nuttall et al, 2003). Otros Acdu se pueden diseñar sobre la base de secuencias de las cadenas pesada y ligera de Ig humanas (Jespers et al, 2004; To et al, 2005). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "Acdu" incluye los Acdu directamente

30

aislados de reservas de V_H , V_{HH} , V_L , o V_{NAR} de cualquier origen a través de presentación en fagos u otras tecnologías, Acdu derivados de los Acdu mencionados anteriormente, Acdu producidos de forma recombinante, así como los Acdu generados
5 a través de la modificación adicional de dichos Acdu mediante humanización, maduración de la afinidad, estabilización, solubilización, camelización u otros métodos de ingeniería de anticuerpos. También se incluyen en la presente invención homólogos, derivados, o fragmentos que retienen la función de
10 unión al antígeno y la especificidad de los Acdu.

Los Acdu poseen propiedades deseables para las moléculas de anticuerpo, tales como alta estabilidad térmica, alta resistencia a los detergentes, resistencia a las proteasas
15 relativamente alta (Dumoulin et al, 2002) y un alto rendimiento de producción (Arbabi-Ghahroudi et al, 1997); también pueden diseñarse por ingeniería para tener una afinidad muy alta mediante aislamiento de una biblioteca inmunitaria (Li et al, 2009) o mediante maduración de la
20 afinidad *in vitro* (Davies & Riechmann, 1996). Las modificaciones adicionales para aumentar la estabilidad, tales como la introducción de enlaces disulfuro no canónicos (Hussack et al, 2011; Kim et al, 2012), también puede llevarse a los Acdu.

25

Un experto en la técnica estará muy familiarizado con estructura de un anticuerpo de dominio único (véase, por ejemplo, 3DWT, 2P42 en Protein Data Bank). Un Acdu comprende un dominio único de inmunoglobulina que retiene el pliegue de
30 inmunoglobulina; lo más notablemente, solo tres CDR / bucles hipervariables forman el sitio de unión al antígeno. Sin

embargo, y como entenderían los expertos en la técnica, no toda la CDR puede ser necesaria para la unión al antígeno. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, una, dos, o tres de las CDR pueden contribuir a la unión y reconocimiento del antígeno mediante el Acdu de la presente invención. La CDR del Acdu o dominio variable se denominan en el presente documento CDR1, CDR2, y CDR3, y se numeran como definen Lefranc, M.-P. et al. (2003).

El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención es específico del receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF1R), un receptor que se encuentra en las superficies celulares. El IGF1R comprende una subunidad alfa, que comprende una parte extracelular que tiene el sitio de unión al factor de crecimiento 1 similar a la insulina) está conectada por un enlace disulfuro a la subunidad beta, que comprende un pequeño dominio extracelular, una región transmembrana y una porción intracelular. El receptor de IGF1 se ensambla en un homodímero o puede formar un heterodímero con el receptor de la insulina. La secuencia del IGF1R puede ser, pero no se limita a la mostrada en la Figura 2 (SwissProt N.º de acceso P08069; SEQ ID NO: 12), o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

El anticuerpo o fragmento del mismo como se describe en el presente documento no debe interferir con la señalización a través del receptor de la insulina (IR) o IGF1R. Específicamente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos como se describe en el presente documento no deben inhibir la fosforilación de AKT inducida por la insulina, ni deben

inducir la fosforilación del IR por su cuenta o inhibir la señalización inducida por insulina; además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos descritos en el presente documento no debe inhibir la fosforilación inducida por IGF-1 del IGF1R. Por otra parte, no deben unirse al receptor de la insulina.

Como se ha indicado anteriormente, el anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un Acdu. El Acdu puede ser de origen de camélido o derivado de un V_{HH} de camélido, y, por lo tanto, puede estar basado en regiones de marco de camélido; como alternativa, la CDR se ha descrita anteriormente se puede injertar en las regiones marco de V_{NAR} , V_{HH} , V_H o V_L . En otra alternativa más, los bucles hipervariables descritos anteriormente pueden injertarse sobre las regiones marco de otros tipos de fragmentos de anticuerpos (Fv, scFv, Fab) de cualquier fuente (por ejemplo, ratón) o proteínas de tamaño y naturaleza similar sobre las que la CDR puede injertarse (por ejemplo, véase Nicaise et al, 2004).

La presente invención abarca además un anticuerpo o fragmento que se "humaniza" usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pero no limitado al mismo, injerto de CDR y de recubrimiento. La humanización de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende la sustitución de un aminoácido en la secuencia con su homólogo humano, como se encuentra en la secuencia consenso humana, sin pérdida de la capacidad de unión al antígeno o la especificidad; este abordaje reduce la inmunogenicidad del anticuerpo o fragmento del mismo cuando se introduce en

sujetos humanos. En el proceso de injerto de CDR, uno o más de una de las CDR definidas en el presente documento se pueden fusionar o injertar a una región variable humana (V_H o V_L), a otro anticuerpo humano (IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM) , a
5 otras regiones de marco del fragmento de anticuerpo humano (Fv, scFv, Fab) o a otras proteínas de tamaño y naturaleza similares sobre las que se pueden injertar las CDR (Nicaise et al, 2004). En tal caso, es probable que la conformación de dicho uno o más de un bucle hipervariable es se conserve y la
10 afinidad y la especificidad del Acdu por su diana (es decir, IGF1R) es probable que se vean mínimamente afectadas. El injerto de CDR se conoce en la técnica y se describe en, al menos, los siguientes documentos: patente de Estados Unidos n.º 6180370, patente de Estados Unidos n.º 5693761, patente de
15 Estados Unidos n.º 6054297, patente de Estados Unidos n.º 5859205, y patente europea n.º 626390. El recubrimiento, también conocido en la técnica como "renovación de la región variable", implica humanizar las posiciones expuestas al disolvente del anticuerpo o fragmento; por lo tanto, los
20 residuos no humanizados enterrados, que pueden ser importantes para la conformación de CDR, se conservan, mientras que el potencial para la reacción inmunológica contra las regiones expuestas al disolvente se reduce al mínimo. El recubrimiento se conoce en la técnica y se
25 describe en, al menos, los siguientes documentos: patente de Estados Unidos n.º 5869619, patente de Estados Unidos n.º 5766886, patente de Estados Unidos n.º 5821123, y patente europea n.º 519596. Los expertos en la técnica también estarán ampliamente familiarizados con los métodos de
30 preparación de tales fragmentos de anticuerpos humanizados y la humanización de las posiciones de aminoácidos.

Por ejemplo, y sin desear ser limitante de ninguna manera, el aislado o purificado o fragmento del mismo específico del IGF1R pueden ser

X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅X₆SGGTVSPTAMGWX₇RQAPGKX₈X₉EX₁₀VX

5 ₁₁HITWSRGTTTRX₁₂ASSVKX₁₃RFTISRDX₁₄X₁₅KNTX₁₆YLMNSLX₁₇X₁₈EDTAVYYCAAS
TFLRILPEESAYTYWGQGT X₁₉VTVSS (SEQ ID NO:4), en la que X₁ es E
o Q; X₂ es K o Q; X₃ es V o E; X₄ es A o P; X₅ es A o E; X₆ es
V o A; X₇ es V o F; X₈ es G o E; X₉ es L o R; X₁₀ es F o W; X₁₁
es G o S; X₁₂ es V o Y; X₁₃ es D o G; X₁₄ es N o S; X₁₅ es A o
10 S; X₁₆ es L o V; X₁₇ es K o R; X₁₈ es A o S; y X₁₉ es L o Q,

o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.
Como alternativa, el anticuerpo aislado o purificado puede
comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste
en:

15 VKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRG
TRVASSVKDRFTISRDSAKNTVYLMNSLKSEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT
QVTVSS (SEQ ID NO:5), denominada en el presente documento
IGF1R-4;

 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWVRQAPGKGLEWVGHITWSRG
20 TTRYASSVKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO:6), denominada en el presente documento
IGF1R-4_H2;

 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRG
TTRYASSVKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
25 TLVTVSS (SEQ ID NO:7), denominada en el presente documento
IGF1R-4_H3;

 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRG
TTRYASSVKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO:8), denominada en el presente documento
30 IGF1R-4_H4;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRG
 TTRYASSVKGRFTISRDSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
 TLVTVSS (SEQ ID NO:9), denominada en el presente documento
 IGF1R-4_H5; y

5 o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

Una secuencia sustancialmente idéntica puede comprender una o más mutaciones conservadoras de aminoácidos. En la técnica se sabe que una o más mutaciones conservadoras de aminoácidos en una secuencia de referencia pueden producir un péptido mutante sin ningún cambio sustancial en las propiedades fisiológicas, químicas, fisicoquímicas o funcionales en comparación con la secuencia de referencia; en tal caso, la referencia y las secuencias mutantes se considerarán polipéptidos "sustancialmente idénticos". Una sustitución conservadora de aminoácidos se define en el presente documento como la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, tamaño, carga o polaridad). Estas mutaciones conservadoras de aminoácidos se pueden hacer en las regiones marco del Acdu manteniendo al mismo tiempo las secuencias de CDR enumeradas anteriormente y la estructura general de la CDR del anticuerpo o fragmento; por tanto, la especificidad y la unión del anticuerpo se mantienen.

En un ejemplo no limitativo, una mutación conservadora puede ser una sustitución de aminoácido. Tal sustitución de aminoácidos conservadora puede sustituir un aminoácido básico, neutro, hidrofóbico, o ácido por otro del mismo grupo. Por el término "aminoácido básico" se entiende los

aminoácidos hidrófilos que tienen un valor pK de la cadena lateral de más de 7, que típicamente tienen carga positiva a pH fisiológico. Los aminoácidos básicos incluyen histidina (His o H), arginina (Arg o R) y lisina (Lys o K). Por el

5 término "aminoácido neutro" (también "aminoácido polar"), se entiende aminoácidos hidrófilos que tienen una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos un enlace en el cual el par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene más estrechamente por uno de

10 los átomos. Los aminoácidos polares incluyen serina (Ser o S), treonina (Thr o T), cisteína (Cys o C), tirosina (Tyr o y), asparagina (Asn o N) y glutamina (Gln o Q). El término "aminoácido hidrófobo" (también "aminoácido no polar") se entiende que incluye los aminoácidos que muestra una

15 hidrofobicidad mayor que cero de acuerdo con la escala de hidrofobicidad consenso normalizada de Eisenberg (1984). Los aminoácidos hidrófobos incluyen prolina (Pro o P), isoleucina (Ile o I), fenilalanina (Phe o F), valina (Val o V), leucina (Leu o L), triptófano (Trp o W), metionina (Met o M), alanina

20 (Ala o A), y glicina (Gly o G). "Aminoácido ácido" se refiere a aminoácidos hidrófilos que tienen un valor pK de la cadena lateral de menos de 7, que normalmente están cargados negativamente a pH fisiológico. Los aminoácidos ácidos incluyen glutamato (Glu o E), y aspartato (Asp o D).

25

La identidad de secuencia se usa para evaluar la similitud de dos secuencias; se determina mediante el cálculo del porcentaje de residuos que son el mismo cuando las dos secuencias se alinean para la máxima correspondencia entre

30 las posiciones de residuos. Cualquier método conocido puede usarse para calcular la identidad de secuencia; por ejemplo,

se dispone de software de ordenador para calcular la identidad de secuencia. Sin desear ser limitante, de identidad de secuencia se puede calcular mediante software, tal como el servicio de NCBI BLAST2 mantenido por el Swiss Institute of Bioinformatics (y como se encuentra en ca.expasy.org/tools/blast/), BLAST-P, explosiva-N, o FASTA-N, o cualquier otro software adecuado que se conozca en la técnica.

Las secuencias sustancialmente idénticas de la presente invención pueden ser al menos 90 % idénticas; en otro ejemplo, las secuencias sustancialmente idénticas pueden ser al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % idénticas, o cualquier porcentaje entre los mismos, a nivel de aminoácidos con las secuencias descritas en el presente documento. Es importante destacar que las secuencias sustancialmente idénticas retienen la actividad y la especificidad de la secuencia de referencia. En una realización no limitante, la diferencia en la identidad de secuencia puede deberse a la mutación o mutaciones conservadoras de aminoácidos. En un ejemplo no limitativo, la presente invención se puede dirigir a un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una secuencia de al menos 95 %, 98 %, o 99 % idéntica a la de los anticuerpos descritos en el presente documento.

El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención también puede comprender secuencias adicionales para ayudar en la expresión, detección o purificación de un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo. Se puede usar cualquiera de estas secuencias o marcadores conocidos por los

expertos en la técnica. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una secuencia de direccionamiento o señal (por ejemplo, pero no limitado a, ompA), un marcador de detección / purificación (por ejemplo, pero no limitado a, c-Myc, His5, o His6), o una combinación las mismas. En otro ejemplo, la secuencia adicional puede ser un sitio de reconocimiento de la biotina tal como el descrito por Cronan et al en el documento W0 95/04069 o Voges et al en el documento W0 / 2004/076670. Como también conocen los expertos en la técnica, se pueden usar secuencias enlazadoras junto con las secuencias o marcadores adicionales, o pueden servir como marcador de detección / purificación.

El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención también puede estar en un formato de presentación multivalente, también denominado en el presente documento presentación multivalente. La multimerización puede conseguirse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, y sin desear ser limitante de ninguna manera, la multimerización puede conseguirse usando moléculas de autoensamblaje, tales como las descritas en Zhang et al (2004a; 2004b) y el documento W02003 / 046560, en el que se producen pentacuerpos mediante la expresión de una proteína de fusión que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención y el dominio de pentamerización de la subunidad B de una familia de toxinas AB₅ (Merritt y Hol, 1995). También puede formarse un multímero usando los dominios de multimerización descritos por Zhu et al. (2010); esta forma, denominada en el presente documento una forma "combody", es una fusión del anticuerpo o fragmento de la

presente invención con un péptido superenrollado que da lugar a una molécula multimérica (Zhu et al., 2010). Otras formas de presentación multivalente también están abarcadas por la presente invención. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, 5 el anticuerpo o fragmento del mismo se puede presentar como un dímero, un trímero, o cualquier otro oligómero adecuado. Esto se puede lograr por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo conexión de enlace directo (Nielson et al, 2000), interacción c-jun/Fos (de Kruif y Logtenberg, 1996), 10 interacción “botón en ojal” (Ridgway et al, 1996).

Otro método conocido en la técnica para la multimerización es dimerizar el anticuerpo o fragmento del mismo usando un dominio de Fc, por ejemplo, pero sin 15 limitaciones a los mismos, los dominios Fc humanos. Los dominios Fc pueden seleccionarse de varias clases, incluyendo, pero sin limitaciones a las mismas, IgG, IgM, o diversas subclases incluyendo, pero sin limitaciones a las mismas, IgG1, IgG2, etc. En este abordaje el gen de Fc en se 20 inserta en un vector junto con el Acdu gen para generar una proteína de fusión Fc-Acdu (Bell et al, 2010; Iqbal et al, 2010); la proteína recombinante se expresa y después se purifica. Por ejemplo, y sin desear ser limitantes de ninguna manera, los formatos de presentación multivalente pueden 25 abarcar formatos quiméricos de anti-IGF1R-4 V_HH unidos a un dominio Fc o fusiones de anticuerpos bi- o tri-específicos con dos o tres anti-IGF1R-4 V_HH que reconocen epítomos únicos. Tales anticuerpos son fáciles de diseñar y de producir, se puede extender considerablemente la semivida en 30 suero de los Acdu y pueden ser excelentes reactivos de formación de imágenes del tumor (Bell et al., 2010).

El dominio Fc en el complejo multimérico como se acaba de describir puede ser cualquier fragmento Fc adecuado conocido en la técnica. El fragmento Fc puede proceder de cualquier fuente adecuada; por ejemplo, el Fc puede ser de
5 ratón o de origen humano. En un ejemplo específico no limitante, el Fc puede ser el fragmento Fc2b de ratón o el fragmento Fc1 humano (Bell et al, 2010; Iqbal et al, 2010). El fragmento Fc puede estar fusionado al extremo N-terminal o C-terminal del V_HH anti-IGF1R-3 o versiones humanizadas de la
10 presente invención. En un ejemplo específico no limitante, el anticuerpo aislado o purificado multimerizado o fragmento como se acaba de describir puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 10, 38, o 11.

15 Cada subunidad de los multímeros descritos anteriormente puede comprender los mismos o diferentes anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención, que pueden tener la misma o diferente especificidad. Además, los dominios de multimerización pueden estar unidos al anticuerpo
20 o fragmento de anticuerpo mediante un enlazador, según sea necesario; un enlazador de este tipo debe tener la suficiente longitud y la composición adecuada para proporcionar una fijación flexible de las dos moléculas, pero no debe obstaculizar las propiedades de unión al antígeno del
25 anticuerpo.

El anticuerpo o fragmento del mismo como se describe en el presente documento puede transmigrar a través de la barrera hematoencefálica. El cerebro se separa del resto del
30 cuerpo por un tejido endotelial especializado conocida como la barrera hematoencefálica (BHE). Las células endoteliales

de la BHE están conectadas por uniones estrechas y previenen eficazmente la entrada muchos compuestos terapéuticos en el cerebro. Además de las bajas tasas de transporte vesicular, una característica específica de la BHE es la existencia de la barrera o barreras enzimáticas y el nivel o niveles elevados de expresión de los transportadores dependientes de ATP en el lado abluminal (cerebro) de la BHE, incluyendo la P-glicoproteína (Gottesman et al., 1993; Watanabe, 1995), que transporta de forma activa diversas moléculas desde el cerebro a la corriente sanguínea (Samuels, 1993). Sólo moléculas pequeñas (<500 Daltons) e hidrofóbicas (Pardridge, 1995) pueden atravesar más fácilmente la BHE. Por lo tanto, la capacidad del anticuerpo o fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente para unirse específicamente al receptor de la superficie, internalizarse en las células endoteliales del cerebro, y sufrir transcitosis a través de la BHE mediante la evasión de la degradación lisosómica es útil en el campo neurológico.

La presente invención abarca también secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas tal como se describe en el presente documento. Dada la degeneración del código genético, una serie de secuencias de nucleótidos tendría el efecto de codificar el polipéptido, como entenderá fácilmente un experto en la técnica. La secuencia de ácido nucleico puede ser optimizada por codones para la expresión en diversos microorganismos. La presente invención también abarca vectores que comprenden los ácidos nucleicos como se acaba de describir. Además, la invención abarca las células que comprenden el ácido nucleico y / o vector como se ha descrito.

La presente invención abarca además el anticuerpo aislado o purificado o fragmentos del mismo inmovilizado sobre una superficie utilizando diversas metodologías; por ejemplo, y sin desear ser limitante, el anticuerpo o
5 fragmento se pueden unir o acoplar a la superficie a través de acoplamiento con marcador de His, unión a biotina, la unión covalente, adsorción, y similares. La inmovilización del mismo anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención puede ser útil en diversas aplicaciones para la
10 captura, purificación o aislamiento de proteínas. La superficie sólida puede ser cualquier superficie adecuada, por ejemplo, pero no limitado la misma, la superficie del pocillo de una placa de microtitulación, los canales de los chips sensores de la resonancia de plasmón superficial (SPR),
15 las membranas, las perlas (tales como perlas magnéticas o basadas en sefarosa u otra resina de cromatografía), vidrio, plástico, acero inoxidable, una película, o cualquier otra superficie útil, tales como nanopartículas, nanohilos y superficies de soportes.

20

La invención también abarca el anticuerpo o fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente unido a una molécula de carga. La molécula de carga puede ser cualquier molécula adecuada, que se libera a través de la BHE mediante
25 el anticuerpo o fragmento del mismo. La molécula de carga puede tener un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 200 kDa; por ejemplo, la molécula de carga puede tener un peso molecular de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55,
30 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185,

190, 195, o 200 kDa, o cualquier peso entre los mismos, o cualquier intervalo de pesos definidos por cualquiera de los dos pesos mencionados anteriormente. En ejemplos específicos, no limitantes, la molécula de carga puede tener un peso molecular de 1 kDa (por ejemplo, pero sin limitaciones, una molécula pequeña, tal como Cy5.5), 1-10 kDa (por ejemplo, pero sin limitaciones, un péptido tal como galanina, 3kDa), aproximadamente 80 kDa (por ejemplo, pero sin limitaciones, un fragmento Fc, enzima, proteína, anticuerpo, etc.), o aproximadamente 200 kDa (por ejemplo, pero sin limitaciones, un anticuerpo monoclonal).

Por ejemplo, y sin desear ser limitante de ninguna manera, la molécula de carga puede ser un agente detectable, un agente terapéutico, un fármaco, un péptido, una enzima, un factor de crecimiento, una citocina, una trampa de receptores, un anticuerpo o fragmento mismo (por ejemplo, IgG, scFv, Fab, V_HH, V_H, V_L, etc), un compuesto químico, un resto de hidratos de carbono, moléculas basadas en ADN (oligonucleótido antisentido, microARN, ARNip, plásmido), un agente citotóxico, vector viral (adenovirus, lentivirus, retrovirus), uno o más liposomas o nanovehículos cargadas con cualquiera de los tipos citados anteriormente de moléculas de carga, o una o más de las nanopartículas, de nanohilos, nanotubos, o puntos cuánticos. La molécula de carga como se ha descrito anteriormente puede ser un agente detectable. Por ejemplo, el o fragmento específico del IGF1R o fragmento del mismo puede estar unido a un radioisótopo, un marcador paramagnético, un fluoróforo, un agente fluorescente, un fluorocromo o colorante en el infrarrojo cercano (NIR, por ejemplo Cy5.5), una microburbuja ecogénica, un marcador de

afinidad, una molécula basada en proteínas, nucleótidos, punto cuántico, de nanopartículas, nanohilos o nanotubos o cualquier otro agente adecuado que se puede detectar por métodos de imagen. El anticuerpo o fragmento del mismo pueden
5 estar unidos a la molécula de carga usando cualquier método conocido en la técnica (tecnología recombinante, la conjugación química, etc.).

La molécula de carga como se describe en el presente
10 documento puede estar unida, también denominada en el presente documento "conjugada", al anticuerpo o fragmento del mismo mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, la molécula de carga puede estar unida al péptido mediante un enlace
15 covalente o una interacción iónica. La unión se puede conseguir a través de una reacción de reticulación química, o por medio de fusión usando metodología de ADN recombinante en combinación con cualquier sistema de expresión de péptidos, tales como bacterias, levaduras o sistemas basados en células
20 de mamíferos. Al conjugar la molécula de carga con el anticuerpo o fragmento del mismo, se puede usar un enlazador adecuado. Los métodos para unir un anticuerpo o fragmento del mismo a una molécula de carga, tal como un agente terapéutico o detectable, serían bien conocidos por un experto en la
25 técnica.

En un ejemplo no limitante, la molécula de carga puede ser un marcador detectable, un radioisótopo, un marcador paramagnético, tal como gadolinio u óxido de hierro, un
30 fluoróforo, un fluorocromo o colorante en el infrarojo cercano (NIR) una microburbuja ecogénica, un marcador de

afinidad (por ejemplo, biotina, avidina, etc.), enzimas, o cualquier otro agente adecuado que se puede detectar por los métodos de diagnóstico por imagen. En un ejemplo específico no limitante, el anti-IGF1R-4 o fragmento del mismo puede estar unido a un colorante de formación de imágenes de fluorescencia en el infrarrojo cercano (NIRF), por ejemplo y sin desear ser limitante, Cy5.5, Alexa680, Dylight680, o Dylight800.

Por tanto, la presente invención proporciona además un método *in vitro* de detección de IGF1R, que comprende poner en contacto una muestra de tejido con uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la presente invención unido a un agente detectable. El complejo IGF1R-anticuerpo se puede detectar mediante el uso de tecnologías de detección y / o de formación de imágenes conocidas en la técnica. La muestra de tejido en el método como se acaba de describir puede ser cualquier muestra de tejido adecuado, por ejemplo, pero sin limitaciones, una muestra de suero, una muestra de tejido vascular, una muestra de tejido tumoral o una muestra de tejido cerebral; la muestra de tejido puede ser de un sujeto humano o animal. La etapa de contacto se realiza en condiciones adecuadas, conocidas por los expertos en la técnica, para la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento del mismo y el IGF1R. La etapa de detección puede llevarse a cabo por cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse a, formación de imágenes ópticas, inmunohistoquímica, imágenes de diagnóstico molecular, ELISA, espectrometría de masas con formación de imágenes, u otro método adecuado. Por ejemplo, y sin desear ser limitante de ninguna manera, el anticuerpo

aislado o purificado o fragmento del mismo unido a un agente detectable puede usarse en inmunoensayos (IA) incluyendo, pero sin limitaciones, enzima IA (EIA), ELISA, "captura rápida de antígeno", "cromatografía rápida" y "EIA rápido".

5 (Por ejemplo, véase Planche et al, 2008; Sloan et al, 2008; Rüssmann et al, 2007; Musher et al, 2007; Turgeon et al, 2003; Fenner et al, 2008).

La presente invención también proporciona un método *in vivo* para detectar la expresión de IGF1R en un sujeto. El método comprende la administración al sujeto de uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo como se describe en el presente documento unido a un agente detectable, a continuación, detectar el anticuerpo marcado o fragmento del mismo unido a IGF1R. La etapa de detección puede comprender cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pero sin limitaciones, PET, SPECT, o formación de imágenes de fluorescencia, o cualquier otro método adecuado. El método como se acaba de describir puede ser útil en la detección de la expresión de IGF1R en los vasos sanguíneos o tejidos, por ejemplo, pero sin limitaciones, tejidos tumorales.

La etapa de detección *in vivo* en los procedimientos descritos anteriormente puede ser toda de formación de imágenes del cuerpo para fines de diagnóstico o de formación de imágenes local en sitios específicos, tales como, pero sin limitaciones, vasos del cerebro o vasos del tumor cerebral, de una manera cuantitativa para evaluar la progresión de la enfermedad o la respuesta del huésped a un régimen de tratamiento. La etapa de detección en los métodos descritos

anteriormente puede ser inmunohistoquímica, o una tecnología de formación de imágenes de diagnóstico no invasiva (molecular), incluyendo, pero sin limitaciones:

- Imágenes ópticas;
- 5 • Tomografía por emisión de positrones (PET), en la que el agente detectable es un isótopo, tal como ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{62}Cu , ^{124}I , ^{76}Br , ^{82}Rb y ^{68}Ga , siendo ^{18}F el más utilizado clínicamente;
- Tomografía computarizada por emisión de fotón único
10 (SPECT), en el que el agente detectable es un marcador radiactivo, tales como $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{201}Tl , ^{133}Xe , dependiendo de la aplicación específica;
- Resonancia magnética (MRI), en la que el agente detectable puede ser, por ejemplo y sin limitaciones,
15 gadolinio, nanopartículas de óxido de hierro y nanopartículas de hierro-cobalto recubiertas por carbono de modo que aumenta la sensibilidad de la RM para la detección de placas.
- Ecografía o ultrasonidos con contraste (CEUS), en la que el agente detectable es al menos una microburbuja
20 acústicamente activa y llena de gas. Los ultrasonidos es una tecnología generalizada para el cribado y la detección precoz de enfermedades humanas. Es menos caro que la RM o la gammagrafía y más seguro que las técnicas de imagen molecular, tales como imágenes con radionúclidos, ya que no
25 implica radiación.

La presente invención proporciona además un método de transporte de una molécula de interés a través de la barrera hematoencefálica. El método comprende la administración al
30 sujeto de la molécula unida a un anticuerpo o fragmento del

mismo como se describe en el presente documento; el anticuerpo o fragmento del mismo transmiga la barrera hematoencefálica. La molécula puede ser cualquier molécula deseada, incluyendo las moléculas de carga como se han descrito anteriormente; la molécula puede estar "unida" al anticuerpo o fragmento del mismo utilizando cualquier método adecuado, incluyendo, pero sin limitaciones, la conjugación o expresión en una proteína de fusión. La administración puede ser por cualquier método adecuado, por ejemplo administración parenteral, incluyendo, pero sin limitaciones, administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) e intramuscular (i.m.). En este método, el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención "transporta" la molécula de interés a través de la BHE a su diana en el cerebro.

15

La presente invención también abarca una composición que comprende uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo como se describe en el presente documento. La composición puede comprender un único anticuerpo o fragmento como se ha descrito anteriormente o puede ser una mezcla de anticuerpos o fragmentos. Además, en una composición que comprende una mezcla de anticuerpos o fragmentos de la presente invención, los anticuerpos pueden tener la misma especificidad o pueden diferir en sus especificidades; por ejemplo, y sin desear ser limitante de ninguna manera, la composición puede comprender anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos del IGF1R (el mismo epítipo o uno diferente).

30

La composición también puede comprender un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. El

diluyente, excipiente o portador puede ser cualquier diluyente, excipiente o vehículo adecuado conocido en la técnica, y deben ser compatibles con otros ingredientes de la composición, con el método de administración de la
5 composición y no es perjudicial para el receptor de la composición. La composición puede estar en cualquier forma adecuada; por ejemplo, la composición puede proporcionarse en forma de suspensión, en forma de polvo (por ejemplo, pero sin limitaciones, liofilizada o encapsulada), cápsula o
10 comprimido. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, cuando la composición se presenta en forma de suspensión, el vehículo puede comprender agua, solución salina, un tampón adecuado, o aditivos para mejorar la solubilidad y / o la estabilidad; la reconstitución para producir la suspensión se
15 efectúa en un tampón a un pH adecuado para asegurar la viabilidad del anticuerpo o fragmento del mismo. Los polvos secos también pueden incluir aditivos para mejorar la estabilidad y / o vehículos para aumentar la masa / volumen; por ejemplo, y sin desear ser limitante, la composición de
20 polvo seco puede comprender sacarosa o trehalosa. En un ejemplo específico no limitante, la composición puede formularse para liberar el anticuerpo o fragmento de la misma en el tracto gastrointestinal del sujeto. Por lo tanto, la composición puede comprender la encapsulación, el tiempo de
25 liberación u otras tecnologías adecuadas para la administración del anticuerpo o fragmento del mismo. Estará dentro de la competencia de un experto en la técnica para preparar composiciones adecuadas que comprenden los presentes compuestos.

La invención también abarca un método de cuantificación de una cantidad de una molécula de carga liberada través de la BHE de un sujeto, en el que la molécula de carga está unida a uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o
5 fragmento del mismo como se describe en el presente documento, comprendiendo el método

a) obtener el líquido cefalorraquídeo (LCR) del sujeto; y

b) usar métodos de proteómica dirigida a cuantificar
10 la cantidad de la molécula de carga unida a uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo en el LCR.

La molécula de carga puede ser cualquier molécula deseada, incluyendo las moléculas de carga, como se han
15 descrito anteriormente; el anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo transmiga la barrera hematoencefálica; y la molécula puede "unirse" al anticuerpo o fragmento del mismo utilizando cualquier método adecuado, incluyendo, pero sin limitaciones, conjugación o expresión en una proteína de
20 fusión, como se ha descrito anteriormente. En el método anterior, el LCR se obtiene de un sujeto usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. La cantidad de LCR requerida para el método de la proteómica dirigida en la etapa b) puede estar entre aproximadamente 1 a 10 μ l; por
25 ejemplo, la cantidad de LCR requerida puede ser de aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10 μ l, o cualquier cantidad intermedia, o cualquier intervalo definido por la cantidad que se acaba de describir. El anticuerpo o
30 fragmento unido a la molécula de carga puede haberse administrado al sujeto antes de la obtención del LCR. Puede

ser necesario un retardo adecuado entre la administración y la liberación anticuerpo o fragmento unido a la molécula de carga a través de la BHE. El retardo puede ser al menos 30 minutos después de la administración del anticuerpo o
5 fragmento unido a la molécula de carga; por ejemplo y sin desear ser limitante de ninguna manera, el retraso puede ser, al menos, 30 minutos, 1 hora, 1,5 horas, 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 3,5 horas, 4 horas, 4,5 horas o 5 horas. Los métodos de proteómica dirigida usados para cuantificar la cantidad
10 del uno o más de anticuerpo o fragmento del mismo unido a la molécula de carga puede ser cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, el método de proteómica dirigida puede ser un método de espectrometría de masas, tal como, pero sin
15 limitaciones, la monitorización de reacción múltiple usando un patrón interno marcado isotópicamente (MRM-ILIS; véase, por ejemplo, Haqqani et al., 2013). La MRM es ventajosa ya que permite la cuantificación rápida, sensible y específica de analitos diana no marcados (por ejemplo, un anticuerpo o
20 fragmento del mismo como se describe en el presente documento) en una muestra biológica. La capacidad de multiplexación del ensayo puede permitir la cuantificación de tanto el anticuerpo o fragmento del mismo como de la molécula de carga.

25

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los ejemplos siguientes. No obstante, cabe entender que estos ejemplos son para fines ilustrativos únicamente y no deben usarse para limitar el alcance de la presente invención de
30 ningún modo.

Ejemplo 1: Purificación de del fragmento recombinante de IGF1R

Se preparó un fragmento recombinante de 933 aminoácidos de longitud del dominio extracelular de IGF1R (mostrado por el recuadro gris en la figura 1; véase también los aminoácidos 1-933 de SEQ ID NO: 12). El fragmento comprendía un péptido señal ácido de 30 aminoácidos en N-terminal, la subunidad alfa completa, un sitio de escisión de furina (RKRR, SEQ ID NO: 13; que separa las subunidades alfa y beta), así como la mayoría de la porción extracelular de la subunidad beta (Figuras 1 y 2).

Clonación. La secuencia del ectodominio del IGF1R de interés se amplificó mediante PCR usando los siguientes cebadores:

5'-CGGGATCCGCCACCATGAAGTCTGGCTCCGGAG-3' (directo; SEQ ID NO:14)

5'-GCTCTAGATCAGAAGTTTTTCATATCCTGTTTTGG-3' (inverso; SEQ ID NO:15)

y se subclonó en el sitio SmaI de pUC19. La secuencia de IGF1R⁹³³ se subclonó después en pCDN4 / myc-His (Invitrogen) para generar pIGF1R⁹³³-His, que permite la expresión de un ectodominio marcado con His como se ha descrito previamente (Samani et al. 2004).

Transfección transitoria. Se generaron partículas de lentivirus que expresan IGF1R⁹³³-His en la línea celular de empaquetamiento 293SF-PacLV, como se detalla anteriormente (Broussau et al., 2008). Brevemente, las células se transfectaron con el vector usando polietilenimina. Se añadió

medio fresco (LC-SFM), que contiene 1 µg/ml de doxiciclina y 10 µg/ml de cumato a las células 5 horas después de la transfección y los sobrenadantes que contienen partículas LV se recogieron después de 48-72 horas, se concentraron mediante ultracentrifugación a 100.000 xg durante 2 horas a 4 °C sobre un cojín de sacarosa al 20 % (Gaillet B et al. 2007), se resuspendieron en medio de LC-SFM suplementado con 1 % de FBS y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

10 Expresión estable. Se generó una línea celular estable, 293SF-cum2-CR5-IGF1R-His, por transducción de las líneas de células 293SF-Cum2 con las partículas de lentivirus respectivas utilizando un protocolo descrito previamente (Gaillet B. et al. 2010). En pocas palabras, $0,5-1,0 \times 10^5$ 15 células 293SF-Cum2 se sembraron en placas de 24 pocillos en 200 µl de medio LC-SFM sin sulfato de dextrano. La suspensión LV se preparó mezclando 200-500 µl de LV con 8 µg/ml de polibreno e incubando durante 30 minutos a 37° C. La suspensión de LV recién preparada se añadió a las células 4 20 horas después de la siembra. Después de 24 horas, se añadieron a las células 500 µl de medio suplementado con sulfato de dextrano. Para aumentar el nivel de expresión, las células se volvieron a transducir hasta 6 veces utilizando el mismo protocolo después de 3-4 días de la recuperación 25 celular. Finalmente se expandieron las células en placas de 6 pocillos y matraces de agitación.

Producción y purificación de proteínas a gran escala. El clon identificado como el mayor productor se amplió en 30 matraces de agitación o rotarios. La producción de proteínas se inició mediante la adición de 1 µg/ml de cumato en medio

fresco, seguido de una incubación de 24 horas a 37 °C y una incubación de 4-8 días a 30 °C. Las células se separaron por centrifugación y los sobrenadantes se filtraron y se concentraron (10x) usando los sistemas de flujo tangencial de filtración (cassetes de ultrafiltración Pellicon, EMD Millipore).

El IGF1R⁹³³-His se purificó utilizando una columna de HisPrep (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, la muestra concentrada se aplicó a una columna His-prep FF (16/10) (GE Healthcare), se equilibró y se lavó con fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 5 mM pH 7,5 y se eluyó con fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM a pH 7,5. Una etapa de elución con citrato de sodio 0,1 M a pH 4,5 a pH 2,5 para eluir la proteína y se agruparon las fracciones pico. El intercambio de tampón se realizó por ultrafiltración usando una membrana de corte de 50 kDa o una columna de desalación con un tampón que contenía fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM y 0,01 % de Tween-80, pH 7,2. La pureza de las dos proteínas se verificó mediante SDS-PAGE y se almacenaron a -80 °C hasta su uso (véanse los ejemplos siguientes).

Ejemplo 2: Inmunización de llama y respuesta en suero

25

Para aislar los V_HH dirigidos al dominio extracelular del IGF1R, se inmunizó una llama con el fragmento IGF1R⁹³³-His recombinante obtenido en el Ejemplo 1.

30

Una llama macho (*Lama glama*) se inmunizó mediante inyección subcutánea, inyección en la parte posterior-

inferior del antígeno recombinante IGF1R⁹³³-His (Ejemplo 1). En el día 1, se inyectaron de 200 µg de antígeno diluido en PBS a 1 ml junto con 1 ml de adyuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO). Se realizaron tres inyecciones
5 adicionales de 100µg del antígeno IGF1R⁹³³-His más adyuvante incompleto de Freund (Sigma) los días 22, 36 y 50. Se realizó una inyección final de 100 µg de antígeno sin adyuvante el día 77. Se extrajo sangre pre-inmune antes de la primera inyección el día 1 y sirvió como control negativo. Se recogió
10 la sangre (10 a 15 ml) los días 29, 43, 57 y 84. La sangre del día 84 se procesó inmediatamente para aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La sangre se diluyó 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se purificaron las PBMC de la sangre con el tubo de
15 Lymphoprep (Axis Shield). Las células se contaron y se almacenaron como alícuotas de aproximadamente 1×10^7 células a -80 °C para su uso futuro.

Se analizó el suero total pre-inmune y post-inmune para
20 una respuesta específica al antígeno IGF1R⁹³³-His mediante ELISA el día 57. Los sueros de llama desde el día 84 se fraccionaron como se ha descrito previamente (Doyle et al, 2008). Las fracciones resultantes A1 (HCAb), A2 (HCAb), G1 (HCAb) y G2 (cIgG) analizaron para determinar la unión
25 específica al antígeno IGF1R⁹³³-His mediante ELISA. Brevemente, 5 µg del antígeno recombinante IGF1R⁹³³-His diluido en PBS se incubó durante la noche (100 µl/pocillo, 18 h, 4°C) en placas de 96 pocillos Maxisorp (Nalgene, Nunc) para recubrir las placas. Las placas se bloquearon con
30 seroalbúmina bovina (BSA), se lavaron con PBS-T (PBS + 0,05 % (v / v) de Tween-20), y se aplicaron diluciones en serie de

suero total pre-inmune, suero total post-inmune (día 57) y suero fraccionado (día 84). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1,5 horas, se lavaron las placas con PBS-T, antes de añadir IgG anti-llama de cabra (1:1000 en PBS) y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar con PBS-T, se añadió el conjugado IgG-HRP anti-cabra de cerdo (1:3,000 PBS) y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Un lavado de PBS-T final se llevó a cabo antes de la adición de 100 µl / pocillo de sustrato TMB (KPL, Gaithersburg, MD); el sustrato se incubó durante 10 minutos. La reacción se detuvo con 100 µl / pocillo de H₃PO₄ 1 M. La absorbancia se leyó a 450 nm.

Ejemplo 3: Construcción de la biblioteca y selección de V_HH de unión a IGF1R

Se construyó una biblioteca de V_HH de llama hiperinmunizada sobre la base de ARN aislado de las PBMC en el Ejemplo 2.

La construcción de la biblioteca y la fijación se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009a, 2009b; Tanha et al, 2003). El ARN total se aisló de aproximadamente 10⁷ PBMC recogidas el día 84 después de la inmunización (Ejemplo 2) utilizando el kit QIAamp RNA Blood Mini (Qiagen). Aproximadamente 5 µg del RNA total se utilizaron como molde para la síntesis de ADNc de primera hebra con cebadores oligo dT utilizando el kit First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare). El ADNc se amplificó mediante una mezcla equimolar de tres cebadores sentido específicos de la región variable:

MJ1: 5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCSMKGTGCAGCTGGTGGAKTCTGGGGGA-3'
(SEQ ID NO:16)

MJ2: 5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGA-3'
(SEQ ID NO:17)

5 MJ3: 5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGCTCAGGTACAGCTGGTGGAGTCT-3'
(SEQ ID NO:18),

y dos cebadores específicos de CH₂ antisentido:

CH₂: 5'-CGCCATCAAGGTACCAGTTGA-3' (SEQ ID NO:19)

10 CH₂b₃: 5'-GGGGTACCTGTCATCCACGGACCAGCTGA-3' (SEQ ID
NO:20).

Brevemente, la mezcla de reacción de PCR se estableció en un volumen total de 50 µl con los siguientes componentes: 1-3 µl de ADNc, 5 pmol de la mezcla el cebador MJ1-3, 5 pmol de CH₂ o los cebadores CH₂b₃, 5 µl de 10x tampón de reacción, 1 µl de dNTP 10 mM, 2,5 unidades de la ADN polimerasa Taq (Hoffmann-La Roche). El protocolo de PCR consistió en una (i) etapa inicial a 94 °C durante 3 minutos, (ii), seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos y (iii) una etapa de extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR amplificados se pasaron por un gel de agarosa al 2 % y se observaron dos bandas principales: una banda de aproximadamente 850 pb, correspondiente a IgG convencional, y una segunda banda de aproximadamente 600 pb, correspondiente a la región V_HH-CH₂ de anticuerpos de cadena pesada de camélido. Las bandas más pequeñas se cortaron y purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se reamplificaron en una segunda PCR en un volumen total de 50 µl usando 1 µl (30 ng) de molde de ADN, 5 pmol de cada uno de cebador MJ7 (5'-CATGTGTAGACTCGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC-3' SEQ ID

N0:21) y cebador MJ8 (5'-

CATGTGTAGATTCCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGACCTGG-3' SEQ ID

N0:22), 5 µl de 10x tampón de reacción, 1 µl de dNTP 10 mM,

2,5 unidades de ADN polimerasa Taq. El protocolo de PCR

5 consistió en (i) una etapa inicial a 94 °C durante 3 minutos,

(ii), seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 57

°C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto y (iii) una

etapa de extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Los

productos de PCR amplificados, que oscilan entre 340 pb y 420

10 pb y que corresponden a fragmentos de V_HH de anticuerpos de

cadena pesada, se purificaron usando el kit QIAquick PCR

Purification Kit (Qiagen), se digirieron con la enzima de

restricción *Sfi*I (New England Biolabs) y volvieron a

purificar usando el mismo kit.

15

Se digirieron 80 µg de vector fagemido pMED1 (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b) con *Sfi*I durante la noche a 50 °C.

Para minimizar la auto-ligación, 20 unidades de las enzimas de restricción *Xho*I y *Pst*I se añadieron para cortar el

20 fragmento cortado y la reacción de digestión se incubó

durante 2 hora adicionales a 37 °C. 60 µg de ADN de fagemido

digerido se ligó con 6 µg de fragmentos de V_HH digeridos

(*Sfi*I durante 5 horas a 50 °C) (relación molar 1:1) durante 3

horas a temperatura ambiente usando el sistema LigaFast Rapid

25 DNA Ligation System (Promega) de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. Los plásmidos ligados se

purificaron usando el kit QIAquick PCR Purification Kit

(Qiagen), se eluyeron en un volumen final de 100 µl y se

transformaron en *E. coli* TG1 electrocompetentes (Stratagene)

30 utilizando 5 µl de alícuota de DNA ligado por reacción de

transformación, como se ha descrito (Arbabi -Ghahroudi et al,

2009b). El tamaño de la biblioteca se determinó que era 5×10^7 como se describe en (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b). Se secuenciaron 20 clones y contenían todas las secuencias de V_HH únicas. La *E. coli*, que contenía la biblioteca se cultivó durante 2-3 horas a 37 °C, 250 rpm, en presencia de 2 % (p / v) de glucosa. A continuación, las bacterias se sedimentaron, se resuspendieron en medio 2xYT/Amp/Glu (2xYT con 100 µg/ml de ampicilina y 2 % (p / v) de glucosa) con 35 % (v / v) de glicerol y se almacenaron a -80 °C en pequeñas alícuotas.

10

Los experimentos de fijación se realizaron esencialmente como se describe en (Arbabi et al, 1997). Dos mililitros de la biblioteca ($2,0 \times 10^{10}$ bacterias) se descongelaron en hielo y se cultivaron en 2xYT/Amp/Glu durante aproximadamente 2 horas a 37 °C ($A_{600} = 0,4 - 0,5$). Las *E. coli* se infectaron posteriormente con 20x de exceso del fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs) durante 1 hora a 37 °C. El cultivo se centrifugó después a 4 °C y los sedimentos bacterianos infectados se resuspendieron en 200 ml de 2xYT / Amp con 50 µg/ml de kanamicina y se incubaron a 37 °C y 250 rpm. Las partículas de fago en el sobrenadante de cultivo se incubaron con 1/5 volumen de 20 % de PEG 8000 / NaCl 2,5 M en hielo durante 1 hora y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 minutos. Los sedimentos del fago se resuspendieron en 1,5 ml de PBS estéril, se titularon y se utilizaron como fago de entrada para la fijación. Para la ronda 1 de fijación, las placas Maxisorp™ de 96 pocillos se recubrieron con 10 µg de IGF1R⁹³³-His recombinante por pocillo en 100 µl de PBS durante la noche a 4 °C. Los pocillos se enjuagaron con PBS y se bloquearon con PBS más 1 % (p / v) de caseína durante 2 horas a 37 °C. Se añadieron aproximadamente 10^{12} fagos a los

15

20

25

30

pocillos bloqueados y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Después de 10 veces de lavado con PBS / 0,1 % (v / v) de Tween 20, los fagos unidos se eluyeron con trietilamina 0,1M, se neutralizaron (50 µl de Tris-HCl 1 M, pH 7,4) y se
5 mezclaron con crecimiento exponencial de *TG1 E. coli*. La titulación del fago eluido se llevó a cabo y las bacterias infectadas se superinfectaron con M13K07 y cultivaron durante la noche a 37 °C. El fago purificado del cultivo de una noche se utilizó como la entrada para la siguiente ronda de
10 fijación. La fijación se continuó durante otras tres rondas. Se utilizó el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente, excepto que la cantidad de antígeno recombinante usado para recubrir las placas se redujo a 7 µg, 5 µg y 5 µg para la segunda, tercera y cuarta ronda de
15 fijación, respectivamente.

Las colonias TG1 individuales obtenidas después de la cuarta ronda de fijación se sometieron a cribado ELISA del fago, esencialmente como se describe en otro lugar (Doyle et
20 al, 2008), con la excepción de que se utilizaron 5 µg/ml del antígeno recombinante IGF1R⁹³³-His para recubrir las placas de microtitulación. Todos los clones positivos se enviaron para secuenciación del ADN. Se seleccionaron clones únicos que dieron señales altas en el ELISA del fago para la expresión y
25 purificación a gran escala usando procedimientos conocidos (véase el Ejemplo 4). Se identificó un clon denominado IGF1 R-4 para un estudio adicional; su secuencia se muestra a continuación.

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRG
 TTRVASSVKDRFTISRDSAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
 TQVTVSS (SEQ ID NO:5)

5 **Ejemplo 4: Humanización de IGF1 R-4**

Para evitar la posible inmunogenicidad del IGF1 R-4 derivado de llama cuando se aplica como vehículo para la BHE para la terapéutica, a los AcdU derivados de camélido se
 10 "humanizó" mediante mutación de residuos de "camélidos" en el V_HH. Cabe señalar que, para el propósito de la humanización, se usó la numeración de Kabat (Kabat et al, 1991) para la identificación de residuos de CDR.

15 *Modelación de la estructura 3D de V_HH de camélido.* Se identificaron estructuras de molde similares a IGF1 R-4 V_HH mediante búsquedas BLAST contra el banco de datos de proteínas (PDB). La estructura 3D del IGF1 R-4 se aproximó utilizando el modelo de homología basado en 4KRP|B (código
 20 PDB| ID de la cadena) como el molde principal, con información adicional de 4FHB | D. A continuación, la estructura de IGF1 R-4 V_HH se construyó mediante la mutación de la estructura principal del molde a la secuencia de IGF1 R-4; esto incluía 35 mutaciones en diversas posiciones. A
 25 continuación, el modelo de IGF1 R-4 V_HH se perfeccionó mediante minimización de la energía con el campo de fuerza AMBER y una liberación gradual de las restricciones, que van desde los bucles de CDR, que se relajaron en primer lugar, a los átomos pesados de la estructura principal de la región
 30 marco, que estaban totalmente relajados solo en la última etapa. El bucle de CDR-H3 del modelo de V_HH se refinó

mediante obtención de muestras conformacionales por minimización (MCM) de Monte-Carlo, en la que se tomaron muestras los ángulos diedros de la región CDR-H3, seguidas de minimización de la energía.

5

Selección de la estructura principal de la cadena pesada humana para la CDR de camélido. La estructura principal de la cadena pesada humana se seleccionó mediante comparación de homología de secuencia estándar contra las bases de datos de la línea germinal humana (VBASE), en contra de otras bases de datos de secuencias (GenBank y SwissProt), y contra de las secuencias consenso marco humanas. Se realizaron búsquedas BLAST para recuperar coincidencias de secuencia con la homología más alta en la región marco únicamente (es decir, excluyendo la CDR) mientras que coincide con la longitud de la CDR. Los marcos humanos más cercanos identificados para IGF1R-4 V_HH correspondían al subgrupo de VH-3 humano. Varias secuencias del marco de VH-3 de la línea germinal humana que eran más similares a IGF1R-4 V_HH también se conservaron además de la secuencia consenso de VH-3 humana. Las secuencias marco de IGF1R-4 V_HH requirieron 18 mutaciones con el fin de llegar a la secuencia consenso humana VH-3 para la humanización marco del 100 %.

Identificación de los residuos marco para retromutaciones. El modelo de IGF1R-4 V_HH y su homólogo totalmente humanizado se caracterizaron para estimar el índice de humanidad, el índice de la propensión al contacto con el antígeno, para delinear las CDR, los residuos canónicos, los residuos del marco inusuales, los posibles sitios de glicosilación, los residuos enterrados, los

residuos de la zona Vernier y la proximidad a CDR. El análisis de estos datos sugirió el diseño de varias variantes humanizadas para el anti-IGF1R V_HH, teniendo cada variante un número variable de retromutaciones a los residuos de camélidos parentales en varias posiciones. Se diseñaron 6 variantes humanizadas para IGF1 R-4 V_HH (IGF1R-4_H1 a IGF1R-4_H6), en las que las variantes contenían hasta 10 retromutaciones. Algunas de estos residuos de retromutaciones de camélido se enterraron dentro del núcleo del dominio de V_HH y, por lo tanto, no cabe esperar que induzcan una respuesta inmunitaria.

Ejemplo 5: Expresión y purificación de las construcciones de V_HH seleccionadas

15

El IGF1R-4 identificado en el Ejemplo 3 y las versiones humanizadas construidas en el Ejemplo 4 (denominados colectivamente en el presente documento "construcciones de V_HH") se subclonaron en plásmidos de expresión para la expresión y purificación de proteínas.

Un vector fagemido que contiene el ADN de la construcción de V_HH IGF1R-4 se purificó usando el kit MiniPrep Kit (Qiagen). El V_HH IGF1R-4 de unión IGF1R-se amplificó por PCR a partir del vector fagemido pMED1, la adición de un sitio de escisión BbsI en el extremo N-terminal un sitio de escisión BamHI en el extremo C-terminal, usando los cebadores:

5' -TATGAAGACACCAGGCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCT-3' (directo;
30 SEQ ID NO:23)

5'-TTGTTTCGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTG-3' (inverso; SEQ ID NO:24)

El fragmento de PCR y el vector de expresión pSJF2H se digirió con las enzimas de restricción BbsI y BamHI (NEB) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la digestión, cada fragmento IGF1R-4 V_HH digerido se ligó en el vector de expresión pSJF2H digerido, utilizando métodos similares a los descritos en Arbabi-Ghahroudi et al. (2009b); los productos de ligación se transformaron después en *TG1 E. coli* electrocompetentes. Los clones se seleccionaron en placas de agar LB + 100 µg / ml de ampicilina y se verificaron mediante secuenciación de ADN.

Los clones humanizados se sintetizaron y directamente se clonaron en pSJF2H, de manera similar a lo descrito anteriormente, y posteriormente se transformaron en *E. coli* TG1 y se seleccionaron como se ha descrito anteriormente.

Expresión de proteínas. Las construcciones de IGF1R-4 V_HH se expresaron en TG1 *E. coli*. Un cultivo durante la noche en medio LB / amp / glu (medio LB suplementado con 100 µg / ml de ampicilina y 1 % de glucosa) se subcultivaron en una dilución de 1:100 dilución en 1l de LB / amp / glu. La expresión de proteínas se indujo a una DO₆₀₀ de 0,8 a 0,9 mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,2 mM. El cultivo se cultivó a 220 rpm durante la noche a 37 °C. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 6000 rpm durante 12 minutos; el sedimento se resuspendió en 35 ml de tampón TES frío (Tris-Cl 0,2 M a pH 8,0, 20 % de sacarosa, EDTA 0,5 mM). La suspensión se incubó en hielo y se agitó con

vórtex cada 10 minutos durante 1 hora. Después se añadieron 45 ml de TES frío (1/8 de volumen del volumen total) e inmediatamente se agitaron en vórtex durante 1 minuto y durante 15 segundos cada 10 minutos a partir de entonces

5 durante 1 hora para extraer la proteína del periplasma. El sobrenadante resultante que contenía V_HH se filtró a través de una membrana de 0,22 µm y se dializó durante la noche en cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) de tampón A (HEPES 10 mM a pH 7,0, NaCl 500 mM). La proteína se

10 purificó usando columnas HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) como se ha descrito previamente (Arbabi-Ghahroudi 2009b). Las fracciones de proteínas eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia de tipo Western antes de dializar contra PBS como se ha descrito previamente (Arbabi-Ghahroudi 2009b).

15 Las fracciones de proteína purificada se agruparon y se dializaron contra PBS + EDTA 3 mM, y se determinó la concentración de proteína.

Ejemplo 6: Caracterización biofísica de anti-IGF1R V_HH

IGF1R-4

Las construcciones de anti-IGF1R V_HH IGF1R-4 expresadas y purificadas en el Ejemplo 4 se caracterizaron mediante cromatografía de exclusión molecular, análisis de la

25 temperatura de fusión y resonancia de plasmón superficial.

Cromatografía de exclusión por tamaño: La cromatografía de exclusión molecular empleando Superdex™ 75 (GE Healthcare) se utilizó para eliminar cualquier agregado posible antes del

30 análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR). El tampón de desarrollo usado fue HEPES 10 mM, pH 7,4 que

contiene NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,005 % de P20. Las concentraciones de las fracciones usadas para el análisis de SPR se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm de longitud de onda. El análisis SEC sugirió que todas las construcciones de IGF1R4 V_HH, excepto H1, eran monoméricas, según el volumen de elución en comparación con los patrones (Figura 3A). Por lo tanto, IGF1 R-4 H1 fue excluido de la evaluación adicional.

Temperatura de fusión: La estabilidad térmica de las construcciones de V_HH IGF1R-4 y humanizadas se evaluó usando la medición de la temperatura de fusión (T_f) mediante espectroscopia de CD. Se utilizó un espectropolarímetro Jasco J-815 equipado con un sistema de control de temperatura de tipo termoeléctrico Peltier (Jasco, Easton, MD, EE.UU.) para llevar a cabo los experimentos. Se utilizó una cubeta de CD con una longitud de trayectoria de 1 mm. Los espectros se registraron en un intervalo de longitud de onda de 180 a 260 nm con una velocidad de barrido de 50 nm / min, tiempo de integración digital (DIT) de 4 segundos, un ancho de banda de 1 nm, datos de tonalidad de 1 nm, y un tiempo de integración de 1 segundo. Para medir la temperatura de fusión o T_f (Greenfield, 2006a; 2006b), los espectros de CD se registraron en un intervalo de temperatura de 30 °C a 96 °C. Todos los espectros CD se restaron del blanco correspondiente a los espectros del tampón. Las mediciones se realizaron con concentraciones de 50 µg / ml de V_HH en tampón de fosfato de sodio 100 mM, a pH 7,4. La desnaturalización de las proteínas inducida por calor se controló a 210 nm para todas las variantes. La fracción plegada (ff) se obtuvo mediante una fórmula como se ha descrito (Greenfield, 2006a; 2006b):

$$ff = ([\theta]_T - [\theta]_U) / ([\theta]_F - [\theta]_U) \quad \text{fórmula I}$$

en la que $[\theta]_T$ es la elipticidad molar a cualquier temperatura, $[\theta]_F$, es la elipticidad molar de la proteína completamente plegada a 30 °C $[\theta]_U$ es la elipticidad molar de la proteína desplegada a 90° C. Se obtuvo la temperatura de fusión (T_f) como un punto medio de la curva de desplegado (fracción plegada (ff) frente a la temperatura) por un ajuste de la curva de regresión no lineal (ecuación sigmoideal de Boltzman) utilizando el software de gráficos GraphPad Prism (versión 4.02 para Windows). Las temperaturas de fusión (T_f) de V_{HH} se determinaron según los datos de elipticidad suponiendo un sistema de dos estados, que está de acuerdo con las curvas de desnaturalización observadas corresponden a una transición brusca en la desnaturalización. Los valores de T_f se tomaron en el punto medio de las curvas sigmoideas de desnaturalización de la fracción plegados (ff) frente a la temperatura.

Los resultados se muestran en la Figura 3B. Las temperaturas de fusión V_{HH} H3, H4, y H5 humanizados mejoraron (más altas) en comparación con el IGF1R-4 V_{HH} , lo que sugiere la mejora de las propiedades biofísicas. Las construcciones de H2 y H6 humanizadas tenían temperaturas de fusión más pobres en comparación con IGF1R-4 V_{HH} . En contraste con IGF1R-4 V_{HH} , ninguno de los V_{HH} humanizados se replegó después de la exposición al calor.

Resonancia de plasmón superficial (SPR): La unión de las construcciones de IGF1R-4 V_{HH} monoméricas a IGF1R humano recombinante inmovilizado (Ejemplo 1) se determinó mediante SPR usando BIACORE 3000 (GE Healthcare). Aproximadamente 3000

unidades de resonancia (UR) de IGF1R humano recombinante se inmovilizaron sobre un chip de CM5 Sensor. La inmovilización se llevó a cabo a una concentración de 10 µg / ml en acetato 10 mM a pH 4,0 utilizando el kit de acoplamiento de aminas suministrado por el fabricante. Los sitios de unión restantes se bloquearon con etanolamina 1 M a pH 8,5. Se usó una superficie bloqueada de etanolamina como una superficie de referencia. Para los estudios de unión, los análisis se llevaron a cabo a 25 °C en HEPES 10 mM, pH 7,4 que contiene NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,005 % de tensioactivo P20 (polioxietilensorbitán; GE Healthcare). Se inyectaron diversas concentraciones del IGF1R-4 V_{HH} sobre el IGF1R humano inmovilizado y las superficies de referencia a un caudal de 20 µl / min. Las superficies se regeneraron con glicina 10 mM a pH 2,0 con un tiempo de contacto de 24 segundos. Los datos se analizaron con el software BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare). Los sensogramas en la Figura 3C muestran que los datos se adaptan bien a un modelo 1:1, dando KD y "tasas de disociación 'mostradas en la Tabla 1. Esto indica que IGF1R-4 y las variantes humanizados son anticuerpos de alta afinidad de un solo dominio de unión al dominio extracelular del IGF1R humano y de rata.

Tabla 1. Afinidad de las construcciones del IGF1R-4 para IGF1R humano como se determina mediante resonancia de plasmón superficial.

	K_D (nM)	k_d (s⁻¹)
IGF	0,	2,

1R-4	32	9×10^{-4}
IGF	1,	6,
1R-4 H2	07	1×10^{-4}
IGF	0,	3,
1R-4 H3	39	4×10^{-4}
IGF	0,	3,
1R-4 H4	45	9×10^{-4}
IGF	0,	4,
1R-4 H5	52	6×10^{-4}
IGF	0,	3,
1R-4 H6	52	8×10^{-4}

Los análisis de SPR se utilizaron más para demostrar que IGF1R-4 V_HH no se une al mismo epítipo sobre el receptor como el ligando natural de IGF-1 (Figura 3D). El experimento se estableció, se llevó a cabo y se analizó como se ha descrito anteriormente. La unión a la superficie del IGF1R humano recién inmovilizado se estudió mediante la inyección del ligando IGF1 humano a una concentración de 25xK_D seguido de coinyección de IGF1R-4 tanto a concentraciones 25xK_D, con velocidades de flujo de 20 µl / min y tiempos de inyección de 5 minutos. Las superficies se regeneraron lavando con tampón de desarrollo. El ligando natural de IGF-1 unido al receptor con saturación alcanzado a 70 UR; el IGF1R-4 V_HH unido al complejo IGF1R - IGF-1 con ~ 265UR esperadas (unidades relativas; saturación de unión). La unión simultánea de IGF1R-4 V_HH e IGF-1 al receptor demuestra que ambos se unían a diferentes epítipos.

La reactividad cruzada de la unión de IGF1R-4 al receptor de insulina humano también se evaluó usando SPR. El

experimento se estableció, se llevó a cabo y se analizó como se ha descrito anteriormente. En pocas palabras, además del IGF1 R humano, aproximadamente 4000 unidades de resonancia (UR) del receptor de la insulina humana recombinante (R & D Systems) se inmovilizaron en una celda separada en un chip sensor CM5. Posteriormente, las diferentes concentraciones de IGF1R-4 se hicieron fluir sobre las superficies (0,5 a 50 nM). Aunque se pudo observar la unión a IGF1R ya a 0,5nM IGF1R-4, se observó falta de unión a la superficie del receptor de la insulina, incluso a 50 nM (figura 3E), lo que sugiere que IGF1R-5 no puede unirse al receptor de la insulina.

Ejemplo 7: Internalización del IGF1R-4 por células endoteliales cerebrales

Para determinar si el IGF1R-4 se internaliza en las células, las células sVARBEC se incubaron con IGF1R-4 marcado con Cy5-5.

20

IGF1R-4 V_HH se marcó con NHS-Cy5.5. El marcaje se realizó a través de un enlace amina estable entre aminas primarias (en el extremo N-terminal y / o en las cadenas laterales de lisina de la proteína) y el éster de NHS. Típicamente, se añadió 10 % v / v de tampón carbonato / bicarbonato 1 M (bicarbonato 759mM, carbonato 258mM) a pH 9,3 a 4 mg de V_HH preparado en PBS (KH₂PO₄, 1,06mM, NaCl 154mM, Na₂HPO 5,6 mM) a pH 7,4 y se ajustó a una concentración final de 4 mg / mL. El NHS-Cy5.5, disuelto en DMSO a 10 mg / mL, se añadió a una relación molar 2X del colorante y la proteína. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas

con varias inversiones en un tubo de 1,5 ml de microcentrífuga. Después de la incubación, el colorante no unido y los subproductos de reacción se filtraron utilizando columnas de desalación Zeba Spin, 7K MWC0 (Pierce) y se midieron usando un espectrofotómetro Beckman DU530 (Beckman Coulter). El IGF1R-4 or FC5 marcado con Cy5.5 como control positivo (1 mg / ml) se incubaron con células endoteliales de cerebro de rata inmovilizadas SV40 (svARBEC) a 4 ° C (Fig. 4, paneles superiores), de modo que solo se permitió el mecanismo de transporte pasivo no específico, o a 37 °C (Fig. 4, paneles inferiores) para permitir el transporte activo, tal como la endocitosis mediada por receptores. La cotinción con aglutinina de germen de trigo y DAPI se llevó a cabo para visualizar la superficie celular y el núcleo, respectivamente. Las células se observaron bajo el microscopio de fluorescencia y se capturaron las imágenes.

Si se incubaron a 4 °C, se encontró IGF1R-4 fuera de las células localizadas con la membrana celular teñida con aglutinina de germen de trigo. Por el contrario, cuando se incubaron a 37 °C, el IGF1R-4 se acumuló e las vesículas dentro de las células, probablemente endosomas, lo que sugiere que el anticuerpo se había internalizado en las células a través de un mecanismo de transporte activo. Se observó un comportamiento similar para FC5, previamente mostrado que entraba en las células por endocitosis dependiente de la energía a través de vesículas recubiertas de clatrina (Abulrob et al. 2005).

Se prepararon, expresaron y aislaron construcciones que comprenden IGF1R-4 V_HH fusionado a un fragmento de anticuerpo murino cristalizable. La secuencia de la construcción de IGF1R-4-mFc se muestra en la figura 5A, con un esquema de la molécula mostrado en la Figura 5B. La proteína de fusión también comprendía un péptido señal en N-terminal (MEFGLSWVFLVAILKGVQC; SEQ ID NO: 37) que no se muestra en la secuencia de la figura 5^a.

El ADNc de IGF1R-4 se clonó en el vector de expresión de mamífero pTT5 (Durocher, 2002) que contenía el fragmento de Fc2b de ratón. Los poliplexos del vector resultante se preformaron mezclando 25 ml de solución de ADN plásmido que contiene 187,5 µg de pTT5-IR5mFc2b, 56,25 µg de PTT-AKTdd (mutante activado de la proteína cinasa B), 18,75 µg de pTT0-GFP (para monitorizar la eficiencia de la transfección), y 112,5 µg de ADN de testículo de salmón (Sigma-Aldrich); y 25 ml de una solución de PEI que contiene 1,125 mg de PEIpro™ (transfección PolyPlus), ambas en medio F17. La mezcla se incubó durante 10 minutos antes de la adición al cultivo celular. Un cultivo de 450 ml de las células CHO que expresan de forma estable una proteína EBNA1 truncada (CHO-3E7) y se cultivaron en medio F17 (Invitrogen) se transfectó con 50 ml de poliplexos. Veinticuatro horas después de la transfección, el cultivo se alimentó con 12,5 ml de 40 % (p / v) de solución de triptona N1 (Organotechnie) y 1,25 l de solución de ácido valproico 200 mM. El cultivo se recogió 8 días después de la transfección y se clarificó por centrifugación. El medio clarificado se filtró a través de una membrana de 0,22 µm antes de su aplicación sobre una columna empaquetada con 5 ml de resina proteína A-rMabSelect SURE (GE

Healthcare). Después de la carga, la columna se lavó con 5 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato pH 7,1 (PBS) y el anticuerpo se eluyó con 100 mM de citrato de sodio a pH 3,0. Las fracciones que contenían el anticuerpo eluido se agruparon y se realizó un intercambio de tampón mediante la carga en una columna de desalado Econo-Pac (BioRad) equilibrada en PBS. El anticuerpo desalado se eliminó mediante filtración pasando a través de una unidad de filtro Millex GP (Millipore) (0,22 μ m) y se alicuotó.

10

Ejemplo 9: Transporte del IGF1 R-4 a través del modelo de la barrera hematoencefálica in vitro

Para evaluar si el IGF1R-4 V_HH, sus versiones humanizadas (H2 a H6) y IGF1R-4-mFc (ejemplo 8) transmigran la barrera hematoencefálica, se usó un ensayo *in vitro* como se describe a continuación. Un diagrama de flujo que resume el experimento se muestra en la Figura 6^a.

Las células endoteliales cerebrales de rata adulta inmortalizadas SV40 (Sv-ARBEC) se utilizaron para generar un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica (BHE) como se describe (Garberg et al, 2005;. Haqqani et al, 2012). Se sembraron Sv-ARBEC (80.000 células / membrana) en un inserto de cultivo tisular recubrieron con colágeno de tipo 1 en 0,1 mg/ml en la cola de la rata (tamaño de poro 1 μ m; área de superficie 0,9 cm², Falcon) en 1 ml de medio de crecimiento. La cámara inferior del conjunto del inserto contenía 2 ml de medio de crecimiento suplementado con el medio acondicionado de astrocitos de rata neonata inmortalizados en una proporción 1:1 (v/v). Cantidades equimolares (5,6 μ M) de

30

controles positivos (FC5) o negativos (A20.1, una toxina A de *Clostridium difficile* que se une a V_HH, y EG2, un V_HH que se une a EGFR), IGF1R-4 V_HH, las versiones humanizadas (H2-H6) o IGF1R-4mFc se analizaron por su capacidad para cruzar la BHE en un modelo de rata *in vitro*. Después de la exposición de cantidades equimolares de los Acdu hacia el lado luminal de la BHE, se tomaron muestras después de 15, 30, y 60 minutos del lado abluminal. El contenido de Acdu de cada muestra se cuantificó después mediante espectrometría de masas (monitorización de reacción múltiple - patrones internos marcado con isotipo; MRM - ILIS) como describen Haqqani et al (2012) (véase la descripción del método a continuación).

Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente:

Los valores cuantificados se pueden representar directamente o los valores de P_{app} (coeficiente de permeabilidad aparente) se pueden determinar con la fórmula dada (Figura 6A) y representarse gráficamente. El valor P_{app} se utiliza habitualmente para determinar la capacidad de una molécula para cruzar la BHE. [Q_r/dt = cantidad acumulada en el compartimiento receptor en función del tiempo; A = área de la monocapa celular; C_0 = concentración inicial de la solución de dosificación]. Los valores de P_{app} son una medida de la permeabilidad específica de compuesto a través de la monocapa endotelial cerebral.

Los resultados se muestran en las figuras 6B-D. Los resultados dados son valores promedio obtenidos a partir de P_{app} de varios experimentos independientes. Ambos controles negativos tienen un valor de P_{app} muy bajo, lo que indica que el transporte paracelular o el transporte no específico de

estos V_{HH} a través del modelo de BHE es mínimo. El IGF1 R-4 V_{HH} tiene un valor de P_{app} alto, lo que indica una alta tasa de transporte a través del modelo *in vitro* de BHE. El P_{app} para IGF1R-4 V_{HH} es 4 veces mayor que el del control positivo
 5 - BHE-permeable para V_{HH} FC5 (documento W0 02/057445). Los resultados proporcionan una fuerte indicación de que IGF1 R-4 sufre un transporte transcelular facilitado a través de las células endoteliales del cerebro *in vitro* y podría tener propiedades similares *in vivo*. Las variantes humanizadas de
 10 IGF1 R-4 V_{HH} H3, H4 y H5 mostraron valores de P_{app} similares (H3) o ligeramente más bajos en comparación con IGF1 R-4 V_{HH} ; la variante H2 mostró una capacidad significativamente atenuada para cruzar el modelo *in vitro* de BHE, mientras que las variantes H6 perdieron completamente esta capacidad, que
 15 muestra el mismo valor P_{app} que el control interno V_{HH} A20.1 (Figura 6C) y se excluyó del estudio adicional. El valor P_{app} para IGF1R-4mFc (Figura 6D) fue similar al de un IGF1R-4 V_{HH} 6 veces más pequeño (Figura 6B), indicando que IGF1R-4 puede "transportar" moléculas grandes (anticuerpos de tamaño) a
 20 través de la BHE. El valor de P_{app} para el control positivo, FC5mFc fue 3 veces más bajo que el de IGF1R-4mFc. Vale la pena señalar que las construcciones que comprenden IGF1R-5 o una versión humanizada unida a una molécula de carga (PM ~ 110 kDa o 180kDa) también ha demostrado que se transporta a
 25 través de la BHE (datos no mostrados).

También se analizó otro V_{HH} , IGF1R-1 de unión a IGF1R-1 como fusión mFc en este ensayo. El IGF1R-1mFc tenía un valor P_{app} solo ligeramente mayor que el valor de P_{app} de A20.1 V_{HH}
 30 (Figura 6D), lo que indica que solo un subconjunto de V_{HH} de

unión a IGF1R aislados de la biblioteca de llama inmune tenía propiedades de trans migración por la BHE.

Cuantificación absoluta de V_HH utilizando el método de

5 *MRM-ILIS*. Los métodos son todos ellos como se describe en Haqqani et al. (2012). En resumen, para desarrollar el SRM (monitorización de reacción seleccionada también conocida como ensayo de monitorización de reacción múltiple (MRM) para V_HH, cada V_HH se analizó primero por nanoLC-MS / MS usando
10 adquisición dependiente de de datos para identificar todos los péptidos ionizables. Para cada péptido, se eligieron de 3 a 5 de los iones de fragmentos más intensos. Se desarrolló un ensayo SRM inicial para monitorizar estos fragmentos en cantidades atomoles de la fracción digerida (aproximadamente
15 100-300 amol). Los fragmentos que mostraron relaciones de intensidad reproducibles en cantidades bajas (es decir, tenían un coeficiente de Pearson $r^2 \geq 0,95$ en comparación con cantidades más altas) se consideraron estables y fueron elegidos para el ensayo de SRM final. Para optimizar aún más
20 el ensayo, se incluyeron también los tiempos de elución para cada péptido, teniendo cuidado de no elegir los péptidos que tienen m / z cercano (relación masa- carga) y los tiempos de elución.

25 Un análisis SRM multiplexado típica de V_HH en medios de células o fluidos corporales (suero o líquido cefalorraquídeo (LCR)) implicó enriquecer una cantidad conocida de ILIS (0,1 - 10 nM), seguido de la inyección de 100 a 400 ng de LCR o proteínas de los medios de cultivo (0,3- 1 µL) o
30 aproximadamente 50 a 100 ng de proteínas EN suero (1-3 nanolitros) en el sistema nanoLC-MS. El precursor de m / z de

cada ion péptido diana se seleccionó en la trampa de iones (y se descartaron los iones no relacionados restantes) en el momento de elución especificado para la diana, seguido de disociación fragmentación por disociación inducida por colisión (CID) y la selección de sólo los iones de fragmentos
5 deseados en la trampa de iones para el control por el detector. Para el análisis de cuantificación, los archivos brutos generados por el LTQ (ThermoFisher) se convirtieron al formato de datos de espectrometría de masas estándar imzXML
10 y se extrajeron las intensidades utilizando un software propio llamado Q-MRM (MRM cuantitativa; véase Haqqani et al. 2012), que es una versión modificada del software MatchRx. Para cada V_HH, se generaron cromatogramas de iones extraídos para cada uno de sus iones del fragmento que consistían en
15 intensidades combinadas dentro de 0,25 Da del fragmento de m / z durante todo el tiempo de elución. Para obtener un valor de la intensidad final para cada fragmento, se sumaron todas las intensidades dentro de 0,5 min de los tiempos de retención esperados. Se definió un V_HH como detectable en una
20 muestra si los fragmentos de al menos uno de sus péptidos mostraba las relaciones de intensidad previstas, es decir, los valores de intensidad finales mostraron una fuerte correlación de Pearson $r \geq 0,95$ y $p < 0,05$ en comparación con los valores de intensidades finales de su correspondiente V_HH
25 puro.

Las mezclas que contenían las muestras de V_HH (medio, suero, LCR), se redujeron, alquilaron y digirieron con tripsina como se ha descrito anteriormente (Haqqani et al.,
30 2012; Gergov et al., 2003). Las fracciones digeridas (péptidos trípticos) se acidificaron con ácido acético (5 %

de concentración final) y se analizaron en una nanoACQUITY UPLC de fase inversa (Waters, Milford, MA) acoplado a espectrómetro de masas LTQ XL ETD o LTQ Orbitrap ETD (ThermoFisher, Waltham, MA). La fracción alícuota deseada de la muestra se inyectó y se cargó en una trampa PepMaps C18 de 300 μm de D.I. $\times$ 0,5 mm 3 μm (ThermoFisher), después se eluyó en una columna de 100 μm D.I. $\times$ 10 cm 1,7 μm BEH130C18 nanoLC (Waters) usando un gradiente de 0 % - 20 % de acetonitrilo (en 0,1 % de ácido fórmico) en 1 minuto, 20 % - 46 % en 16 minutos, y 46 % - 95 % en 1 minuto a una velocidad de flujo de 400 nl / min. Los péptidos eluidos se ionizaron en el espectrómetro de masas por ionización por electropulverización (ESI) de MS / MS y análisis de SRM utilizando CID para la fragmentación de los iones peptídicos. La CID se realizó con helio como gas de colisión en la energía de colisión normalizada del 35 % y 30 ms de tiempo de activación. Los tiempos de inyección en la trampa de iones lineal se ajustaron por el instrumento utilizando un valor diana del control automático de ganancia (AGC) de 6×10^3 y un tiempo máximo de acumulación de 200 ms.

Los péptidos específicos de V_HH utilizados para la detección y cuantificación de cada V_HH en el ensayo multiplexado se muestran en la Tabla 2.

25

Tabla 2. Tabla 2. Los péptidos utilizados en la detección nano LC-MRM de FC5, FC5-SIIT, EG2, A20.1, IGF-1R-5 y albúmina. (a) En varios estudios descritos, los ensayos se multiplexaron en diferentes combinaciones para el control simultáneo de la misma muestra; (b) péptido marcado; fuertemente; (c) Los límites de detección y cuantificación

30

del ensayo SRM para cada péptido variaron de 1,5-2,5 ng / ml. 1 ng / ml corresponde a aproximadamente 60 a 70 pM de V_HH. A20-1 como se describe en Hussack et al, 2011b; EG2 como se describe en Iqbal et al., 2010.

5

Proteína	Firmas	SEQ ID NO:	Única
IGF1R-4	EFVGHITWSR	25	Sí
	LSCEVSGGTVSPTAMGWFR	26	Sí
FC5	ITWGGDNTFYNSVK	27	Sí
FC5-ILIS	ITWGGDNTFYNSVK ^(b)	27	Sí
A20.1	TTYADSVK	28	Sí
	EFVAAGSSTGR	29	Sí
	TFSMDPMAWFR	30	Sí
	DEYAYWGQGTQVTSSGQAGQGSEK	31	Sí
EG2	DFSDYVMGWFR	32	Sí
	LEESGGGLVQAGDSL	33	Sí
	NMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVNSAGTYVSPR	34	Sí
Albúmina	APQVSTPTLVEAAR	35	Sí

Ejemplo 10: Imágenes ópticas in vivo y ex-vivo

Para determinar si IGF1R-4 V_HH se acumula en el cerebro
10 después de la inyección intravenosa (iv), IGF1R-4 V_HH y el
control negativo A20.1 V_HH se conjugaron con el trazador
fluorescente en el infrarrojo cercano, Cy5.5 y se purificaron
como se describe en el Ejemplo 7. Se inyectaron 2,5 µmg/kg
cualquiera de IGF1 R-Cy5.5 o Cy5.5 A20.1 (en volumen de 150
15 µl) a través de la vena de la cola en ratones CD-1 desnudos,
y se obtuvieron imágenes en directo en posición prono en
eXplore Optix preclinical imager MX2 (Advanced Research

Technologies, QC) 30 minutos después de la inyección. Una hora después de las inyecciones, los animales fueron anestesiados con 2% de isoflurano (Baxter Canada, Mississauga, ON, Canadá), se realizó una punción cardiaca y se perfundieron 10 ml de solución salina (Baxter Canada, Mississauga, ON, Canadá) suplementado con 1 EU / ml de heparina (Organon, Toronto, ON, Canadá) desde la misma aguja a 2 ml / min para eliminar la sangre (comprobada por la aparición de fluido libre de sangre en el sitio de incisión del ventrículo derecho). Los cerebros perfundidos se retiraron y la imagen ex vivo y se obtuvieron imágenes con explore Optix. Los protocolos de formación de imágenes fueron como se describe en detalle en Iqbal et al., 2011.

Los resultados se muestran en la Figura 7. Los ratones inyectados con Cy5.5-IGF1R-4 mostraron una señal óptica mejorada en la región de la cabeza in vivo (paneles superiores, flecha) y en el cerebro ex vivo después de la perfusión (paneles inferiores, flechas), mientras que los ratones a los que se inyectó Cy5.5-A20.1 solo mostraron señal de fondo baja. Los datos sugieren que IGF1R-4 V_HH puede liberar agente de imagen (Cy5.5, 1 kDa) a través de la barrera hematoencefálica *in vivo*.

Ejemplo 11: Conjugación del IGF1R-4 a galanina

Para determinar si IGF1R-4 V_HH puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) in vivo y "TRANSPORTAR" a través de la BHE una molécula que no puede atravesar la BHE por sí misma, el neuropéptido galanina se conjugó químicamente con IGF1R-4 V_HH o IGF1R4-mFc y se administró por vía sistémica. La

galanina es un péptido neuroactivo que produce analgesia por unión DE GALR1 y GALR2 que se expresa en el tejido cerebral. Cuando se administra periféricamente, galanina no tiene efectos analgésicos, porque no puede atravesar la BHE por sí misma (Robertson et al., 2011).

El IGF1R-4 V_HH se conjugó con un fragmento de galanina (Gal) de rata con el extremo C-terminal modificado con cisteamida (Biomatic) (GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRSFSDKHGLT-cisteamida, SEQ ID NO: 36). El esquema para la conjugación se muestra en la Figura 8^a.

Brevemente, 5 mg de IGF1R-4 V_HH (Ejemplo 4) en 0,5X PBS, EDTA 2,5 mM a [2 mg / ml] se mezclaron con 436,4 µl de 2,5 mg / ml de sulfosuccinimidil-4- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (7,5x relación molar en exceso). Después, la mezcla se lavó abundantemente con gas nitrógeno y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (T.A.) para permitir que el brazo éster de NHS de sulfo-SMCC reaccione con las aminos en el V_HH. Posteriormente, el sulfo-SMCC que no ha reaccionado se retiró de IGF1R-5 V_HH activado con maleimida utilizando una columna de 10 ml 7K Zeba (Pierce). Antes de la carga de la muestra, la columna se lavó 3 veces con 5 ml de PBS y se centrifugó a 1000x g durante 2 minutos. Después de la carga de la muestra, la columna se llenó con 200 µl de PBS y se centrifugó durante 2 minutos a 1000xg. En cuanto las construcciones de IGF1R-Fc, se hicieron reaccionar 5 mg con ~68 µl de sulfo-SMCC (6,5x relación molar en exceso) de la misma manera como se ha descrito anteriormente.

Por separado y al mismo tiempo, la galanina modificada en el extremo C con cisteamida (Gal-cya) se preparó disolviendo 10 mg de polvo liofilizado en 10 ml de agua sin endotoxina para formar una reserva de 1 mg / ml (el polvo de galanina-cya tiene una pequeña cantidad de DTT para evitar la formación de puentes disulfuro durante la purificación). Finalmente, se añadieron 100 μ l de EDTA 0,5 M (concentración final 5 mM).

Las construcciones de IGF1R-4 V_HH (2,6 ml) y IGF1R-Fc activadas con maleimida purificada se diluyeron a 5 ml con 0,5X de PBS, EDTA 2,5 mM y después se añadieron 1 ml Gal-cya agitando en vórtex. Las muestras se lavaron abundantemente con nitrógeno, se sellaron y se incubaron durante la noche a 4 °C. El día siguiente, la Gal-cya que no había reaccionado se eliminó usando una columna Amicon-15 10K y 30K (Millipore), respectivamente. La muestra se añadió a la columna y se centrifugó a 4000xg durante 7 minutos hasta que el volumen se redujo a 5 ml. Se añadieron 5 ml de 0,5X PBS, EDTA, 2,5 mM a la muestra de 5 ml que queda en el inserto de la columna y se centrifugó de nuevo hasta que la muestra se redujo a 4 ml. Las muestras de conjugados se añadieron a continuación a una columna de 7K Zeba 10 ml (Pierce), preparada como se ha descrito anteriormente, y luego se centrifugaron durante 2 minutos a 1000xg.

Las muestras conjugadas de IGF1R-4-Gal y IGF1R-4 Fc-Gal se pasaron a continuación por un gel de 16 % o 10 % de SDS-PAGE no reductor y se tiñeron con plata para confirmar el cambio de tamaño de peso molecular después de la conjugación. La reacción se tituló para lograr ~ 1 a 2 moléculas de

galanina por construcciones de V_HH o IGF1R-Fc. Los resultados confirman la carga de galanina en el IGF1R-4 V_HH (véase la Figura 8B).

5 *Eliminación de endotoxina y determinación de los niveles de endotoxina:* Las endotoxinas se retiraron usando columnas de centrifugación en membrana de celulosa con corte de peso molecular Amicon Ultra (Millipore). En primer lugar, 15 ml de la preparación de V_HH se pasaron a través de una columna
10 Amicon-15-50K MWCO por centrifugación a 4000xg durante 10 minutos; se recogió la elución. A continuación, se añadió esta elución a una columna Amicon-15-10K MWCO y se centrifugó a 4000xg durante 7-10 minutos, lo que da lugar a una reducción del volumen del sobrenadante de 15 ml a 7,5 ml. El
15 volumen del sobrenadante en la columna se ajustó de nuevo a 15 ml mediante la adición de PBS. La columna se centrifugó de nuevo como se ha descrito anteriormente. El sobrenadante se recogió y los niveles de endotoxina se midieron con el sistema Endosafe-PTS usando cartuchos con un intervalo de
20 sensibilidad de 10-0,1EU / ml (Charles River Laboratories International). Se cargaron 25 ul de la muestra en cada uno de los 4 pocillos en el cartucho y se diluyeron en caso necesario. Solo las muestras con EU <1 por 1 mg se utilizaron para los estudios en animales.

25

Ejemplo 12: Transporte del IGF1 R-4-Gal usando el modelo de Hargreaves

Para evaluar si la IGF1R-4-Gal o IGF1R-4-mFc-Gal
30 (Ejemplo 11) transmigran la barrera hematoencefálica, se

utilizó un ensayo in vivo, previamente descrito en la publicación de patente internacional N° WO 2011/127580.

Se utilizó un modelo de rata de hiperalgesia inflamatoria, similar al descrito por Hargreaves et al. (1988). Los animales se introdujeron por grupos de tres (modelo de Hargreaves) por jaula de polipropileno y se les permitió acceso libre a comida y agua. Los experimentos se realizaron en un ciclo de 12 horas de luz / oscuridad a una temperatura de 24 °C y una humedad relativa de 50 ± 5 %. Todos los procedimientos con los animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales de la NRC y de conformidad con las guías del Consejo Canadiense de cuidados de estos animales.

En este modelo, se inyectó a ratas Wistar macho, de 6-8 semanas de edad (intervalo de peso 230-250 g) un volumen bajo (100 µl con una aguja de calibre 30) de adyuvante completo de Freund (CFA; *M. tuberculosis* muertos con calor (Sigma) suspendidos en emulsión de aceite: solución salina 1:1) en la pata trasera derecha con anestesia breve con isoflurano (3 %). El CFA induce la liberación de sustancias proinflamatorias que activan los nociceptores y crean un estado crónico de dolor en hiperalgesia (una mayor sensibilidad al calor nocivo). La latencia de la retirada de la pata se midió mediante la aplicación de un estímulo radiante en la superficie plantar de ambas patas traseras (pata inflamada y no inflamada control), utilizando el equipo de medición de analgesia plantar para la estimulación de la pata (CITI Modelo # 336TG Life Science, Inc.). El tiempo que tarda el animal en responder lamiéndose o agitando su pata se

interpretó como una respuesta positiva (latencia de retirada de la pata). La lámpara de intensidad de la luz se ajustó para obtener las latencias de retirada de la pata de referencia entre 17 a 20 segundos en ambas patas traseras antes de la administración de CFA. Si no se produce una respuesta de retirada en 20 segundos, el haz de luz se apagó automáticamente para evitar daños en los tejidos y a la pata se le asignó la puntuación máxima.

10 Dos días después de la inyección de CFA y antes de la administración de los compuestos, se manipuló a los animales y se les aclimató en el equipo de medición de analgesia durante al menos 60 minutos con el objetivo de reducir el estrés y prevenir respuestas positivas falsas. El valor basal se midió en ambas patas para verificar el dolor desarrollado (hiperalgesia térmica); la pata no inflamada se utilizó como un control frente a la pata inyectada. Los animales con una latencia de retirada de la pata de más de 6 segundos para la "pata inflamada" y menos de 17 segundos para el "pata normal" se excluyeron del experimento.

25 Para determinar si IGF1R-4-Gal se libera través de la barrera hematoencefálica y puede fijarse a los receptores diana (GALR1 y 2) en el parénquima cerebral, las ratas recibieron una inyección en la vena caudal de IGF1R-4-galanina (3mg / kg) o IGF1R-4mFc-Galanina (2 mg/kg o 5 mg/kg) o compuestos de control tres días después de de la inyección de CFA. La latencia de retirada de la pata (PWL) se analizó para cada pata trasera (inflamada y no inflamada) cada 15 minutos durante 3 horas. Un aumento de la latencia de retirada de la pata indica la supresión de la hiperalgesia

térmica, que solo se puede obtener a través de la liberación éxito de galanina en el parénquima cerebral por IGF1R-4. La galanina solo puede inducir analgesia cuando está presente en el parénquima cerebral y por sí sola no puede cruzar una BHE
5 intacta (Robertson et al., 2011)

Los resultados se analizaron como cursos temporales de las latencias de retirada de la pata (PWL, segundos) frente al tiempo (minutos o horas) (Figuras 9^a y C). Figura 9B
10 muestra los resultados que el área bajo la curva (AUC) y se comparan con el % de efecto máximo posible (% MPE). La figura 9D muestra los resultados como porcentaje de inversión (de la hiperalgesia térmica) en la respuesta máxima (Emax).

15 Los resultados muestran que la galanina administrada por vía intravenosa no reducir el dolor en comparación con PBS. Por el contrario, una sola inyección de FC5-Gal o IGF1R4-Gal produce un efecto analgésico medible, lo que sugiere que este V_HH "transporta" la galanina a través de la BHE para producir
20 un efecto analgésico mediante la unión a GALR1 y / o 2 en el parénquima cerebral. El efecto de IGF1R-4-Galanina es dependiente de la dosis y significativamente más pronunciado que el inducido por FC5-Gal, lo que sugiere que el receptor IGF1R tiene una mayor tasa de transporte a través de la BHE
25 que el receptor FC5 putativo. Los resultados demuestran que IGF1R-4 V_HH puede "transportar" moléculas de al menos 3.000 Da a través de la BHE utilizando la ruta de transcitosis mediada por receptor (el PM combinado del conjugado anticuerpo-péptido es de aproximadamente 18 kDa). Se requiere
30 un transporte activo, mediado por el receptor, ya que se sabe que la BHE es impide el paso de todas las moléculas

hidrófilas de más de 0,5 kDa. Del mismo modo, IGF1R4-MFC-galanina produce una supresión dependiente de la dosis de la hiperalgesia térmica mientras que A201.mFc-galanina es ineficaz. Esto sugiere que IGF1R-4 V_{HH} puede transportar moléculas similares en tamaño a los anticuerpos (~ 80 kD) a través de la BHE. El IGF1R-4mFc-galanina fue aproximadamente 5 veces más potente en la supresión de la hiperalgesia térmica que IGF1R-4-galanina, lo que sugiere que la presentación bivalente y la semivida en plasma extendida contribuyen a mejorar la eficacia de la administración al cerebro.

Ejemplo 13: Niveles de IGF1R-4 en LCR y plasma

Se llevó a cabo un ensayo *in vivo* para determinar si IGF1R-4 V_{HH} es capaz de cruzar al cerebro y, concretamente, al líquido cefalorraquídeo (CSF), así como para cuantificar su presencia en LCR y suero.

Los animales se introdujeron individualmente en jaulas de polipropileno y se les permitió acceso libre a comida y agua. Los experimentos se realizaron en un ciclo de 12 horas de luz / oscuridad a una temperatura de 24 °C y una humedad relativa de 50 ± 5 %. Todos los procedimientos con los animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales de la NRC y de conformidad con las guías del Consejo Canadiense de cuados de estos animales.

Se utilizaron ratas Wistar macho, de 8-10 semanas de edad (intervalo de peso, 230-250 g). Para obtener la muestra de LCR, se afeitó el pelo del cuello y la región de la cabeza

de los animales y, a continuación, se les introdujo en una cámara de plexiglás y se les anestesió moderadamente con isoflurano al 3 %; el LCR se obtuvo esencialmente como describen Nirogi et al (2009). La rata anestesiada se colocó

5 en un instrumento CON marco metálico (generosamente proporcionado por el Dr. Vinicio Granados-Soto; CINVESTAV, México) y se inmovilizó mediante barras en las orejas. La posición de la cabeza del animal se mantuvo hacia abajo a un ángulo de aproximadamente 45°. Frotando con un algodón

10 empapado en etanol (al75 %) se hizo visible una superficie deprimible con la aparición de un rombo entre la protuberancia occipital y la columna vertebral del atlas. Una aguja de calibre 27 cubierta de tubos de PE-10 (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canadá) de 10 cm de longitud y

15 conectada a una jeringa de insulina 100 cc se insertó en horizontal y centralmente en la cisterna magna para la extracción de LCR sin hacer incisiones. Dos puntos de resistencia (clics) a lo largo de la trayectoria de la aguja se pueden sentir fácilmente, debido a la rotura de la piel y

20 al desgarro de la membrana atlanto-occipital. Cuando la aguja pasa el segundo punto de resistencia, se extrajo el LCR (40-100 µl) a través de la aguja aplicando una succión suave de la jeringa de insulina. A continuación de la toma de muestras de LCR, se extrajo la sangre correspondiente por punción

25 cardíaca tras toracotomía y se colocó en tubos vacutainer (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canadá) con activador de la coagulación y gel, y después se centrifugó a 3.000 xg durante 15 minutos. Se retiró el suero usando una micropipeta y rápidamente se congeló a -80 °C hasta su posterior

30 análisis.

Las muestras de suero y de LCR se analizaron por espectrometría de masas y cuantificación basada en nanoLC-SRM como se describe en el Ejemplo 9.

5 La extracción de LCR es un procedimiento delicado durante el cual el LCR puede contaminarse fácilmente con sangre. Puesto que se espera que las cantidades de V_HH sean mucho menores en el LCR (<0,1 %) que en la sangre, incluso una ligera contaminación con sangre podría comprometer
10 seriamente el valor de una muestra de LCR individual. Por consiguiente, era necesario desarrollar criterios de exclusión estrictos para las muestras de LCR contaminadas con sangre. Para evaluar la relación albúmina de la sangre-LCR, se desarrolló un método nanoLC-SRM para cuantificar los
15 niveles de albúmina en el plasma y en el LCR. Se seleccionó un péptido APQVSTPTLVEAAR (SEQ ID NO:37) en función de su tiempo de retención único y el valor m / z (Mol Pharm) con el fin de tener un mínimo de interferencia con otros picos de péptidos en el ensayo multiplex. La intensidad del péptido se
20 cuantificó en las muestras tanto de LCR como de plasma utilizando SRM como se ha descrito anteriormente. La relación de albúmina se calculó como sigue para cada rata:

Relación de albúmina = Intensidad por nl de plasma
25 analizado / Intensidad por nl de LCR analizado

Se consideró que una relación de 1.500 e inferiores como sangre contaminada.

30 Los resultados se muestran en la Figura 10. Los animales fueron co-inyectados con 6 mg / kg cada uno de IGF1R-4, FC5 o

A20.1, y el LCR y el suero se recogieron 30 minutos después de la inyección. La figura muestra que los niveles la relación LCR/suero para IGF1R-4 es de 1,2 %, en comparación con el 0,98 % para FC5 y 0,017 % para A20.1, lo que sugiere que tanto IGF1 R-4 como FC5 tienen una mayor penetración en el LCR y la exposición del cerebro al anticuerpo de control co-inyectado, A20.1.

Ejemplo 14: Inmunodetección de IGF1R-4-mFc

10

Para comprobar que niveles altos de IGF1R-4-mFc detectados en el LCR después de la administración periférica se originan, al menos en parte, en el espacio extracelular del parénquima, en otras palabras, que la construcción intacta había cruzado la BHE, se realizó inmunodetección de IGF1R-4-mFc en los cerebros de ratas.

En pocas palabras, los cerebros de los animales se recogieron inmediatamente después de la perfusión de los animales con PBS 24 horas después de la inyección de 6 mg / kg en la vena de la cola de IGF1R-4-mFc o A20.1mFc. Los cerebros se congelaron y seccionaron en criotomo en secciones de 12 µm. Las secciones se fijaron durante 10 minutos a T.A en 100 % de metanol, se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron durante 1 hora en suero de cabra normal al 10 % (NGS) que contenía 0,3 % de Triton X-100 en PBS 1x. Se aplicó anti-m-IgG Fcγ-cy3 de cabra (n.º de cat. 115-165-071, Jackson Immuno Research, lote n.º 106360) a 1:200 en 5 % de NGS que contiene 0,3 % de Triton X-100 en 1X de PBS, durante una noche a 4 °C. Las secciones se lavaron tres veces en 1X PBS, Vasculature-staining lectin RCAI (n.º de cat. FL-1081,

Vector) 1: 500 en 1 x PBS y se enriquecieron con 2µg/ml de Hoechst (n.º de cat. H3570, Invitrogen) para teñir los núcleos. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia Olympus 1X81 utilizando los objetivos 10X y 60X y los canales como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Objetivos y canales utilizados para la microscopia de fluorescencia.

	Molécula fluorescente	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Vasos RCAI	FITC	495	518
Núcleos	- Hoechst	350	461
Hoechst33342			
IGF1R-5-m-Fc	Cy3	531	593

10

Los resultados se muestran en la Figura 11. La inmunodetección de Fc de ratón mostró una fuerte tinción de los vasos del cerebro a través de diferentes regiones del cerebro, así como tinción del parénquima cerebral perivascular, que indica que el IGF1R-4-mFc se acumula en los vasos del cerebro y, también, transmigra la BHE en el parénquima cerebral circundante. Por el contrario, ninguna tinción específica de mFc se pudo detectar en los animales inyectados con A20.1mFc. Los resultados apoyan la afirmación de que el aumento de los niveles de of IGF1R-4-mFc en el LCR son indicativos de la trans migración de la construcción de la BHE. Esto está aún más fuertemente apoyado por la observación de que la galanina unida a IGF1 R-4 inducía respuesta farmacológica inducida (analgesia) en los receptores GALR1 y GALR2 del parénquima. Colectivamente, los resultados

15

20

25

transmigración de la BHE in vitro, farmacocinética in vivo (niveles en suero / LCR) y los resultados de la farmacodinámica (modelo de Hargreaves) demuestran que IGF1 R-4 V_HH trasmigra la BHE intacta a tasas significativamente más altas que otros V_HH a través de transcitosis activa mediada por receptores activada por su unión a los epítomos de IGF1R y que puede "transportar" un intervalo (1-80 kDa) de moléculas que, de otro modo, no podrían atravesar de la barrera hematoencefálica.

10

Ejemplo 15: Efecto de IGF1R-4 sobre la función "fisiológica" de IGF1R

Desde una perspectiva de seguridad, es importante demostrar que el anticuerpo de la invención no interfiere con la función fisiológica del receptor, es decir, la señalización inducida por su ligando natural, IGF-1, al unirse a su receptor para la administración de fármacos a través de transcitosis mediada por receptor. En vista de esto, es importante demostrar que IGF1R-4 V_HH o IGF1R-4-mFc no interfieren con la señalización fisiológica a través de IGF1R o del receptor de insulina relacionado (IR) inducida por sus ligandos naturales.

Para determinar si IGF1R-4 induce la señalización a través de IGF1R o de IR solo, o interfiere con la señalización estimulada por los ligandos naturales del receptor, IGF-1 o insulina, se determinó su efecto sobre la fosforilación de los propios recetores o la cinasa aguas abajo estimulada por receptor, Akt, en las células SV-ARBEC.

30

Las SV-ARBEC se cultivaron hasta la confluencia en medio base M199 medio suplementado con peptona, D-glucosa, aminoácidos BME, vitaminas BME, solución de antibiótico / antimicótico y suero bovino fetal, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Las células se cambiaron a medio libre de suero 18 horas antes del tratamiento. Se añadió IGF1R-4 V_HH o fusión de IGF1R-4-Fc (100 nM o 500 nM) a las células 1 hora antes de la adición de 200 ng / ml de IGF-1, 10 µg / ml de insulina o vehículo. Las células se incubaron con ligandos o vehículo durante 20 minutos y después se lavaron dos veces en solución salina equilibrada de Hank. Después, las células se lisaron usando tampón 1x RIPA (Cell Signaling Technology) suplementado con 1 % de Triton-X 100 y un cóctel inhibidor de la proteasa (Sigma). Se dio a las células 2 ráfagas de 20 segundos en un sonicador en baño de agua y los lisados se clarificaron por centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos. La concentración de proteína se determinó utilizando el sistema de ensayo de proteínas DC (laboratorios Bio-Rad). La misma cantidad en µg de las muestras de proteína se resolvieron en un gel de poliacrilamida gradiente SDS 4-20 % a 125 V y se transfirieron a una membrana de PVDF. La fosfo-Akt (Ser 473) se detectó mediante incubación durante la noche en una dilución de 1:1.000 del anticuerpo primario contra su diana (Cell Signaling Technology) seguido de una 1 hora de incubación con anticuerpo secundario IgG-HRP anti-conejo de cabra, después se hizo reaccionar con reactivo ECL Plus y se visualizó en la película de autorradiografía. Los valores de densitometría se determinaron utilizando el software de Un-Scan-It (Silk Scientific Inc.).

Los resultados se muestran en la Figura 12. El análisis de transferencia de tipo Western de la fosforilación de Akt mostró que IGF1R-4 no inhibía la fosforilación de Akt inducida con 10 μ g / ml de insulina o por 200 ng /ml de IGF-1 cuando se aplicaron junto con 100 nM de IGF1 R-4 o IGF1R-4-mFc o 500 nM de IGF1R-4-mFc. Tampoco ninguna de V_HH o las fusiones de Fc indujeron la señalización Akt por sí solos (figura 12A, 12B y 12C, marcados con "-4"). Los resultados demuestran que incluso en presentación bivalente en el formato de fusión de Fc, el IGF1R-4 no provoca la dimerización del receptor y la señalización aguas abajo, y, por lo tanto, no interfiere con la función del receptor en presencia del ligando natural. Esta característica de IGF1R-4 ("aglutinante silencioso") es importante para su aplicación como vehículo para la BHE para la terapéutica, ya que confiere un perfil de seguridad favorable.

Las realizaciones y los ejemplos descritos en el presente documento son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica. Los inventores pretenden que las variaciones de las realizaciones anteriores, incluidas las alternativas, modificaciones y equivalentes, estén abarcadas por las reivindicaciones. Además, la combinación tratada de características podría no ser necesaria para la solución de la invención.

REFERENCIAS

Todas las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones mencionadas en el presente documento y en toda

la solicitud se incorporan en el presente documento por referencia.

Abbott NJ (2013) Blood-brain barrier structure and
5 function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis.* 36(3):437-49.

Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P,
Stanimirovic D (2005) The blood-brain barrier transmigration
10 single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem.* 2005 Nov;95(4):1201-14.

Arbabi-Ghahroudi, M. Desmyter A, Wyns L, Hamers R., and
15 Muyldermans S (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies, *FEBS Lett* 414, 521-526.

Arbabi-Ghahroudi, M., To, R., Gaudette, N., Hirama, T.,
20 Ding, W., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2009a) *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 59-66.

Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., and Tanha, J.
(2009b) *Methods Mol. Biol.* 525, 187-216.

25

Bell, A., Wang, Z.J., Arbabi-Ghahroudi, M., Chang, T.A.,
Durocher, Y., Trojahn, U., Baardsnes, J., Jaramillo, M.L.,
Li, S., Baral, T.N., O'Connor-McCourt, M., Mackenzie, R., and
Zhang, J. (2010) *Cancer Lett.* 289, 81-90.

30

Broussau, S., Jabbour, N., Lachapelle, G., Durocher, Y.,
Tom, R., Transfiguracion, J., Gilbert, R. and Massie, B.
(2008) Mol Ther 16, 500-507.

5 Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987) J. Mol. Biol. 196,
901-917.

Davies J., and L. Riechmann, Affinity improvement of
single antibody VH domains: residues in all three
10 hypervariable regions affect antigen binding.
Immunotechnology 2 (1996) 169-179

De Kruif, J., and Logtenberg, T. (1996) J. Biol. Chem.
271, 7630-7634.

15

Demeule, M.; Currie, J. C.; Bertrand, Y.; Che, C.;
Nguyen, T.; Regina, A.; Gabathuler, R.; Castaigne, J. P.;
Beliveau, R. Involvement of the low-density lipoprotein
receptor-related protein in the transcytosis of the brain
20 delivery vector angiopep-2, J. Neurochem. 2008, 106, 1534-
1544.

Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaighe, A., Meersman,
F., Heremans, K., Frenken, L.G., Muyldermans, S., Wyns, L.,
25 and Matagne, A. (2002) Protein Sci 11, 500-515.

Durocher, Y., S. Perret, et al. (2002). "High-level and
high-throughput recombinant protein production by transient
transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells."
30 Nucleic Acids Res 30(2): E9.

Doyle, P.J., Arbabi-Ghahroudi, M., Gaudette, N., Furzer, G., Savard, M.E., Gleddie, S., McLean, M.D., MacKenzie, C.R., and Hall, J.C. (2008) *Mol. Immunol.* 45, 3703-3713.

5 Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., and Wall, R. (1984) *J. Mol. Biol.* 179, 125-142

Erdlenbruch B, Alipour M, Fricker G, Miller DS, Kugler W, Eibl H, Lakomek M (2003) Alkylglycerol opening of the
10 blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. *Br J Pharmacol.* 140(7):1201-10.

Fenner, L., Widmer, A.F., Goy, G., Rudin, S., and Frei,
15 R. (2008) *J. Clin. Microbiol.* 46, 328-330.

Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilotte, A., Malenfant, F., Mullick, A., Garnier, A., and Massie, B. (2010) *Biotechnol Bioeng* 106, 203-215.
20

Gan Y, Jing Z, Stetler RA, Cao G (2013) Gene delivery with viral vectors for cerebrovascular diseases. *Front Biosci (Elite Ed)*. 5:188-203. Review.

25 Garberg, P.; Ball, M.; Borg, N.; Cecchelli, R.; Fenart, L.; Hurst, R. D.; Lindmark, T.; Mabondzo, A.; Nilsson, J. E.; Raub, T. J.; Stanimirovic, D.; Terasaki, T.; Oberg, J. O.; Osterberg, T. In vitro models for the blood-brain barrier, *Toxicol. In Vitro* 2005, 19, 299-334.

Gergov, M.; Ojanpera, I.; Vuori, E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 795, 41-53.

Gaillet B, Gilbert R, Amziani R, Guilbault C, Gadoury C, Caron AW, Mullick A, Garnier A, Massie B (2007) High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the cumate gene-switch. *Biotechnol Prog.* Jan-23(1):200-9

Gottesman et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 62, 385-427 (1993)
 Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) *Nature* 363, 446-448.

Haqqani AS, Caram-Salas N, Ding W, Brunette E, Delaney CE, Baumann E, Boileau E, Stanimirovic D (2012) Multiplexed evaluation of serum and CSF pharmacokinetics of brain-targeting single-domain antibodies using a NanoLC-SRM-ILIS method. *Mol Pharm.* 2013 May 6;10(5):1542-56.

Hargreaves KM, Troullos ES, Dionne RA, Schmidt EA, Schafer SC, Joris JL (1988) Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin Pharmacol Ther.* 44(6):613-21.

Huang YL, Säljö A, Suneson A, Hansson HA (1995) A new approach for multiple sampling of cisternal cerebrospinal

fluid in rodents with minimal trauma and inflammation. *J Neurosci Methods*. 63(1-2):13-22.

Hussack, G., Hiram, T., Ding, W., MacKenzie, R., and
5 Tanha, J. (2011) *PLoS ONE* 6, e28218.

Hussack G, Arbabi-Ghahroudi M, van Faassen H, Songer JG, Ng KK, MacKenzie R, Tanha J (2011b) Neutralization of *Clostridium difficile* toxin A with single-domain antibodies
10 targeting the cell receptor binding domain. *J Biol Chem*. 286(11): 8961-76.

Iqbal U. Abulrob A. Stanimirovic D B (2011) Integrated platform for brain imaging and drug delivery across the
15 blood-brain barrier. *Methods Mol. Biol.* 686, 465-481.

Iqbal, U., Trojahn, U., Albaghdadi, H., Zhang, J., O'Connor, M., Stanimirovic, D., Tomanek, B., Sutherland, G., and Abulrob, A. (2010) *Br. J. Pharmacol.* 160, 1016-1028.
20 Jespers, L., Schon, O., Famm, K., and Winter, G. (2004) *Nat. Biotechnol.* 22, 1161-1165.

Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different
25 specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol*. 1991;147:1709-19.

Kim, D.Y., Kandalaft, H., Ding, W., Ryan, S., van
30 Fassen, H., Hiram, T., Foote, S.J., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2012) *PEDS* advance access August 30, 2012, 1-9.

Kornhuber ME, Kornhuber J, Cimniak U (1986) A method for repeated CSF sampling in the freely moving rat. *J Neurosci Methods*. 17(1):63-8.

5 Lefranc, M.-P. et al.,(2003) *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77.

Li S, Zheng W, Kuolee R, Hiram T, Henry M, Makvandi-Nejad S, Fjallman T, Chen W, Zhang J. Pentabody-mediated
10 antigen delivery induces antigen-specific mucosal immune response. *Mol Immunol* 2009;46:1718-26.

Merritt, E.A., and Hol, W.G. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 165-171.

15

Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D (2001) Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J*. 2002 Feb;16(2):240-2.

20

Musher, D.M., Manhas, A., Jain, P., Nuila, F., Waqar, A., Logan, N., Marino, B., Graviss, E.A. (2007) *J. Clin. Microbiol.* 45, 2737-2739.

25

Nhan T, Burgess A, Cho EE, Stefanovic B, Lilge L, Hynnen K.(2013) Drug delivery to the brain by focused ultrasound induced blood-brain barrier disruption: Quantitative evaluation of enhanced permeability of cerebral vasculature using two-photon microscopy. *J Control*
30 Release.172(1):274-280.

Nicaise M, Valeio-Lepiniec M, Minard P, Desmadril M.
(2004) Affinity transfer by CDR grafting on a
nonimmunoglobulin scaffold. *Protein Sci.* 13(7): 1882-1891.

5 Nielsen, U.B., Adams, G.P., Weiner, L.M., and Marks,
J.D. (2000) *Cancer Res.* 60, 6434-6440.

10 Nirogi, R.; Kandikere, V.; Mudigonda, K.; Bhyrapuneni,
G.; Muddana, N.; Saralaya, R.; Benade, V. (2009) A simple and
rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and
its application for the assessment of drug penetration into
the central nervous system, *J. Neurosci. Methods*, 178, 116-
119.

15 Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Doughty, L., Pearson, K.,
Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., Hattarki, M., Carmichael, J.A.,
Irving, R.A., and Hudson, P.J. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270,
3543-3554.

20 Pardridge, W. M.; Buciak, J. L.; Friden, P. M. Selective
transport of an anti-transferrin receptor antibody through
the blood-brain barrier in vivo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*
1991, 259, 66-70.

25 Pardridge, W.M., *Adv. Drug Delivery Reviews*, 15, 5-36
(1995)

Pardridge, W. M. Drug and gene delivery to the brain:
the vascular route, *Neuron*. 2002, 36, 555-558.

Planche, T., Aghaizu, A., Holliman, R., Riley, P., Poloniecki, J., Breathnach, A., and Krishna, S. (2008) *Lancet Infect. Dis.* 8, 777-784.

5 Preston E, Slinn J, Vinokourov I, Stanimirovic D. (2008) Graded reversible opening of the rat blood-brain barrier by intracarotid infusion of sodium caprate. *J Neurosci Methods.* 168(2):443-9.

10 Ridgway, J.B., Presta, L.G., and Carter, P. (1996) *Protein Eng.* 9, 617-621.

Robertson CR, Flynn SP, White HS, Bulaj G (2011) Anticonvulsant neuropeptides as drug leads for neurological
15 diseases. *Nat Prod Rep.* 28(4):741-62.

Rüssmann, H., Panthel, K., Bader, R.C., Schmitt, C., and Schaumann, R. (2007) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 115-119.
20

Samani, A.A., Chevet, E., Fallavollita, L., Galipeau, J., and Brodt, P. (2004) *Cancer Research* 64, 3380-3385.

Samuels B.L., *J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 54, 421-429
25 (1993)

Sloan, L.M., Duresko, B.J., Gustafson, D.R., and Rosenblatt, J.E. (2008) *J. Clin. Microbiol.* 46, 1996-2001.

30 Sumbria RK, Zhou QH, Hui EK, Lu JZ, Boado RJ, Pardridge WM.(2013) Pharmacokinetics and brain uptake of an IgG-TNF

decoy receptor fusion protein following intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous administration in mice. *Mol Pharm.* 10(4):1425-31.

- 5 Tanha, J., Muruganandam, A., and Stanimirovic, D. (2003) *Methods Mol. Med.* 89, 435-449.

To, R., Hirama, T., Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., Wang, P., Xu, P., Ni, F., and Tanha, J. (2005) *J. Biol. Chem.* 10 280, 41395-41403.

Turgeon, D.K., Novicki, T.J., Quick, J., Carlson, L., Miller, P., Ulness, B., Cent, A., Ashley, R., Larson, A., Coyle, M., Limaye, A.P., Cookson, B.T., and Fritsche, T.R. 15 (2003) *J. Clin. Microbiol.* 41, 667-670.

Watanabe, T., *Acta Oncol.*, 34, 235-241 (1995)

Xiao G, Gan LS.(2013) Receptor-mediated endocytosis and 20 brain delivery of therapeutic biologics. *Int J Cell Biol.* doi: 10.1155/2013/703545. Epub 2013 Jun 11. Yaksh TL, Rudy TA (1976) Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav.* 17(6):1031-6.

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

Zhang, J., Li, Q., Nguyen, T.-D., Tremblay, T.-L.,
Stone, E., To, R., Kelly, J., and MacKenzie, C.R. (2004a) J.
Mol. Biol. 341, 161-169.

5 Zhang, J., Tanha, J., Hiram, T., Khiew, N.H., To, R.,
Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.R., and MacKenzie,
C.R. (2004b) J. Mol. Biol. 335, 49-56.

Zhu et al., Immunology and Cell Biology (2010) 88:667-
10 675.

Patente europea N.º 519596

Patente europea N.º 626390

Patente de EE.UU. N.º 5693761

15 Patente de EE.UU. N.º 5766886

Patente de EE.UU. N.º 5821123

Patente de EE.UU. N.º 5859205

Patente de EE.UU. N.º 5869619

Patente de EE.UU. N.º 6054297

20 Patente de EE.UU. N.º 6180370

Documento WO 02/057445

WO 2011/127580

Documento WO 95/04069

Documento WO/2004/076670

25 Documento WO2003/046560

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo que se une específicamente al epítipo del receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF1R), en el que el anticuerpo o fragmento del mismo transmigre la barrera hematoencefálica y en el que el epítipo está unido específicamente por el anticuerpo de la SEQ ID NO:5.

2. Un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo que comprende

una secuencia de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de GGTVSPTA (SEQ ID NO:1);

una secuencia de CDR2 de ITWSRGTT (SEQ ID NO: 2); y

una secuencia de CDR3 de AASTFLRILPEESAYTY (SEQ ID NO: 3),

en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es específico del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R).

3. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende la secuencia

X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅X₆SGGTVSPTAMGWX₇RQAPGKX₈X₉EX₁₀VX₁₁HITWSRGTTTRX₁₂ASSVKX₁₃RFTISRDX₁₄X₁₅KNTX₁₆YLQMNSLX₁₇X₁₈EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT X₁₉VTVSS (SEQ ID NO:4), en la que X₁ es E o Q; X₂ es K o Q; X₃ es V o E; X₄ es A o P; X₅ es A o E; X₆ es V o A; X₇ es V o F; X₈ es G o E; X₉ es L o R; X₁₀ es F o W; X₁₁ es G o S; X₁₂ es V o Y; X₁₃ es D o G; X₁₄ es N o S; X₁₅ es A o S; X₁₆ es L o V; X₁₇ es K o R; X₁₈ es A o S; y X₁₉ es L o Q,

o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

4. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRG
TTRVASSVKDRFTISRDSAKNTVYLMNSLKS EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
TQVTVSS (SEQ ID NO:5);

10 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWVRQAPGKGLEWVGHITWSRG
TTRYASSVKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO:6);

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRG
TTRYASSVKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
15 TLVTVSS (SEQ ID NO:7);

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFVGHITWSRG
TTRYASSVKGRFTISRDS SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO:8);

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRG
20 TTRYASSVKGRFTISRDS SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO:9); y

o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

5. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de dominio único (Acdu).

6. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 5, en el que el Acdu es de origen de camélido.

7. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está en un formato de presentación multivalente.

5

8. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está unido a un fragmento Fc.

10

9. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 8, en el que el fragmento Fc es el Fc2b ratón o el Fc1 humano.

15

10. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 9, en que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10, 38, o 11.

20

11. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo transmigra la barrera hematoencefálica.

25

12. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

30

13. Un vector que comprende la molécula ácido nucleico de la reivindicación 12.

14. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el

que el anticuerpo o fragmento del mismo está inmovilizado sobre una superficie.

15. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está unido a una molécula de carga.

16. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 15, en el que la molécula de carga tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 1kDa a aproximadamente 200 kDa.

17. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 15 o 16, en el que la molécula de carga unida al anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un agente detectable, un agente terapéutico, un fármaco, un péptido, un factor de crecimiento, una citocina, una trampa de receptor, un compuesto químico, un resto de hidrato de carbono, una enzima, un anticuerpo o fragmento del mismo, una molécula basada en ADN, un vector viral, o un agente citotóxico; uno o más liposomas o nanovehículos cargados con un agente detectable, un agente terapéutico, un fármaco, un péptido, una enzima, y un anticuerpo o fragmento del mismo, una molécula basada en ADN, un vector viral, o un agente citotóxico; o uno o más de nanopartículas, nanohilos, nanotubos, o puntos cuánticos.

18. Una composición que comprende uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 14 a 17 y un

vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

19. Un procedimiento *in vitro* de detección de IGF1R, que
5 comprende

- a) poner en contacto una muestra de tejido con uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, unido a un agente detectable; y
- 10 b) detectar el agente detectable unido al anticuerpo o fragmento del mismo unido a IGF1R en la muestra de tejido.

20. El método de la reivindicación 19, en el que la muestra es una muestra de suero, una muestra de tejido vascular, una muestra de tejido tumoral o una muestra de
15 tejido cerebral de un sujeto humano o animal.

21. El método de la reivindicación 19 o 20, en el que la etapa de detección (etapa b)) se realiza usando formación de
20 imágenes ópticas, inmunohistoquímica, imágenes de diagnóstico molecular, ELISA, o espectrometría de masas acoplada a formación de imágenes o cualquier otro método adecuado.

22. Un método *in vivo* para detectar la expresión de
25 IGF1R en un sujeto, que comprende:

- a) la administración al sujeto de uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 unido a un agente detectable; y
- 30 b) detectar el agente detectable unido al anticuerpo o fragmento del mismo unido a IGF1R.

23. El método de la reivindicación 22, en el que etapa de detección (etapa b)) se realiza usando PET, SPECT, imágenes de fluorescencia, o cualquier otro método adecuado.

5 24. Un método de transporte de una molécula de carga a través de la barrera hematoencefálica (BHE), que comprende:

 a) la administración al sujeto de uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 11 unido a la molécula de carga,

10 en el que el uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo transporta la molécula de carga a través de la BHE.

25. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 24, en el que la molécula de carga
15 tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 1kDa a aproximadamente 200 kDa.

26. El método de la reivindicación 24 o 25, en el que la molécula de interés unida al anticuerpo o fragmento del mismo
20 puede ser un agente detectable, un agente terapéutico, un fármaco, un péptido, un factor de crecimiento, una citocina, una trampa de receptor, un compuesto químico, un resto de hidrato de carbono, una enzima, un anticuerpo o fragmento del mismo, una molécula basada en ADN, un vector viral, o un
25 agente citotóxico; uno o más liposomas o nanovehículos cargados con un agente detectable, un agente terapéutico, un fármaco, un péptido, una enzima, y un anticuerpo o fragmento del mismo, una molécula basada en ADN, un vector viral, o un
30 agente citotóxico; o uno o más de nanopartículas, nanohilos, nanotubos, o puntos cuánticos.

27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que la administración es por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), o intramuscular (i.m.).

5 28. Un método de cuantificación de una cantidad de una molécula de carga liberada través de la BHE de un sujeto, en el que la molécula de carga está unida a uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 11, comprendiendo el método

10 a) obtener el líquido cefalorraquídeo (LCR) del sujeto; y

 b) usar métodos de proteómica dirigida a cuantificar la cantidad de la molécula de carga unida a uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo en el
15 LCR.

RESUMEN

La presente invención se refiere a anticuerpos aislados o purificados o fragmentos de los mismos específicos para el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF1R) y a su uso como herramientas terapéuticas. Específicamente, la presente invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos para IGF1R. También se describen composiciones para uso en terapia, así como métodos terapéuticos.

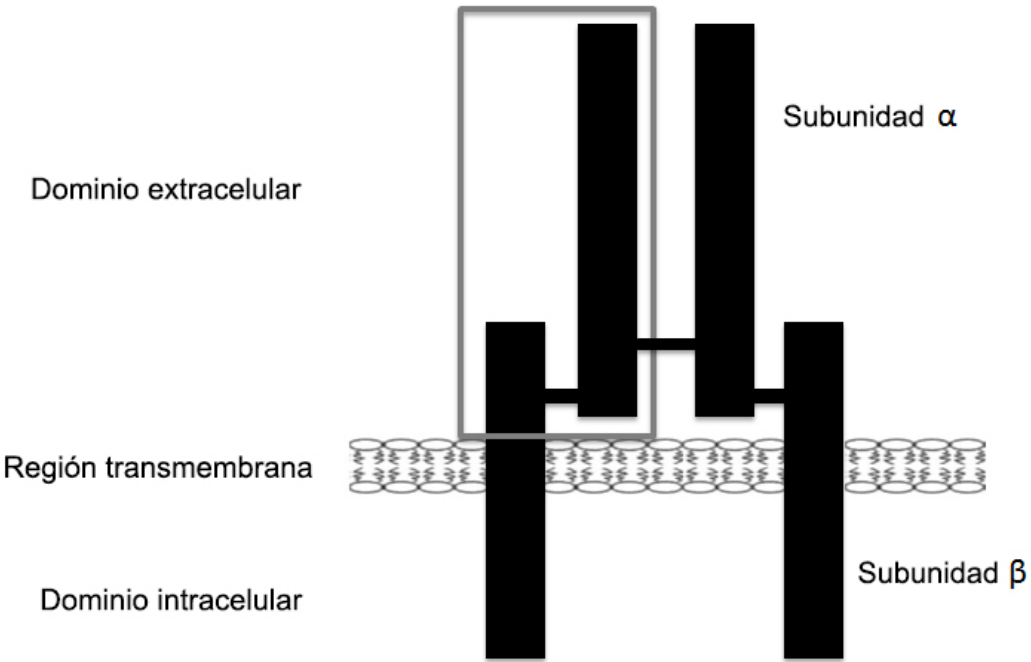


FIG. 1

<i>MKSGSGGGSP</i>	<i>TSLWGLLFLS</i>	<i>AALSLWPTSG</i>	<i>EICGPGIDIR</i>	<i>NDYQQLKRLE</i>	<i>NCTVIEGYLH</i>	60
<i>ILLISKAEDY</i>	<i>RSYRFPKLTIV</i>	<i>ITEYLLLFVR</i>	<i>AGLESLGDLF</i>	<i>PNLTVIRGWK</i>	<i>LFYNYALVIF</i>	120
<i>EMTNLKDIGL</i>	<i>YNLRNITRGA</i>	<i>IRIEKNADLC</i>	<i>YLSTVDWSLI</i>	<i>LDAVSNNYIV</i>	<i>GNKPPKECGD</i>	180
<i>LCPGTMECKP</i>	<i>MCEKTTINNE</i>	<i>YNYRCWTTNR</i>	<i>CQKMCPSTCG</i>	<i>KRACTENNEC</i>	<i>CHPECLGSCS</i>	240
<i>APDNDTACVA</i>	<i>CRHYYYAGVC</i>	<i>VPACPPNTYR</i>	<i>FEGWRCVDRD</i>	<i>FCANILSAES</i>	<i>SDSEGFVIHD</i>	300
<i>GECMQECPSG</i>	<i>FIRNGSQSMY</i>	<i>CIPCEGPCPK</i>	<i>VCEEEKKTKT</i>	<i>IDSVTSQML</i>	<i>QGCTIFKGNL</i>	360
<i>LINIRRGNNI</i>	<i>ASELENFMGL</i>	<i>IEVVTGYVKI</i>	<i>RHSHALVSL</i>	<i>FLKNLRLILG</i>	<i>EEQLEGNYSF</i>	420
<i>YVLDNQNLQQ</i>	<i>LWDWDHRNLT</i>	<i>IKAGKMYFAF</i>	<i>NPKLCVSEIY</i>	<i>RMEEVTGTKG</i>	<i>RQSKGDINTR</i>	480
<i>NNGERASCES</i>	<i>DVLHFTSTTT</i>	<i>SKNRIIITWH</i>	<i>RYRPPDYRDL</i>	<i>ISFTVYYKEA</i>	<i>PFKNVTEYDG</i>	540
<i>QDACGSNSWN</i>	<i>MVDVDLPPNK</i>	<i>DVEPGILLHG</i>	<i>LKPWTQYAVY</i>	<i>VKAVTLMVE</i>	<i>NDHIRGAKSE</i>	600
<i>ILYIRTNASV</i>	<i>PSIPLDVLSA</i>	<i>SNSSSQLIVK</i>	<i>WNPPSLPNGN</i>	<i>LSYYIVRWQR</i>	<i>QPQDGYLYRH</i>	660
<i>NYCSKDKIPI</i>	<i>RKYADGTIDI</i>	<i>EEVTENPKTE</i>	<i>VCGGEKGPPC</i>	<i>ACPKTEAEKQ</i>	<i>AEKEEAERYK</i>	720
<i>VFENFLHNSI</i>	<i>FVPRPERkrr</i>	<i>DVMQVANTTM</i>	<i>SSRSRNTTAA</i>	<i>DTYNITDPEE</i>	<i>LETEYPPFES</i>	780
<i>RVDNKERTVI</i>	<i>SNLRPFITYR</i>	<i>IDIHSCNHEA</i>	<i>EKLGCASANF</i>	<i>VFARTMPAEG</i>	<i>ADDIPGPVTW</i>	840
<i>EPRPENSIFL</i>	<i>KWPEPENPNG</i>	<i>LILMYEIKYG</i>	<i>SQVEDQRECV</i>	<i>SRQEYRKYGG</i>	<i>AKLNRLNPNG</i>	900
<i>YTARIQATSL</i>	<i>SGNGSWTDPV</i>	<i>FFYVQAKTGY</i>	<i>ENFIHLIIAL</i>	<i>PVAVLLIVGG</i>	<i>LVIMLYVFHR</i>	960
<i>KRNNSRLGNG</i>	<i>VLYASVNPEY</i>	<i>FSAADVYVPD</i>	<i>EWEVAREKIT</i>	<i>MSRELQGGSF</i>	<i>GMVYEGVAKG</i>	1020
<i>VVKDEPETRV</i>	<i>AIKTVNEAAS</i>	<i>MRERIEFLNE</i>	<i>ASVMKEFNCH</i>	<i>HVVRLLGVS</i>	<i>QGQPTLVIME</i>	1080
<i>LMTRGDLKSY</i>	<i>LRSLRPENEM</i>	<i>NPVLAPPSLS</i>	<i>KMIQMAGEIA</i>	<i>DGMAYLNANK</i>	<i>FVHRDLAARN</i>	1140
<i>CMVAEDFTVK</i>	<i>IGDFGMTRDI</i>	<i>YETDYRKGK</i>	<i>KGLLPVRWMS</i>	<i>PESLKDGVFT</i>	<i>TYSDVWSFGV</i>	1200
<i>VLWEIATLAE</i>	<i>QPYQGLSNEQ</i>	<i>VLRFVMEGGL</i>	<i>LDKPDNCPDM</i>	<i>LFELMRMCWQ</i>	<i>YNPKMRPSFL</i>	1260
<i>EIISSIKEEM</i>	<i>EPGFREVSYF</i>	<i>YSEENKLPEP</i>	<i>EELDLEPENM</i>	<i>ESVPLDPSAS</i>	<i>SSSLPLPDRH</i>	1320
<i>SGHKAENGPG</i>	<i>PGVLVLRASF</i>	<i>DERQPYAHMN</i>	<i>GGRKNERALP</i>	<i>LPQSSTC</i>		1367

FIG. 2

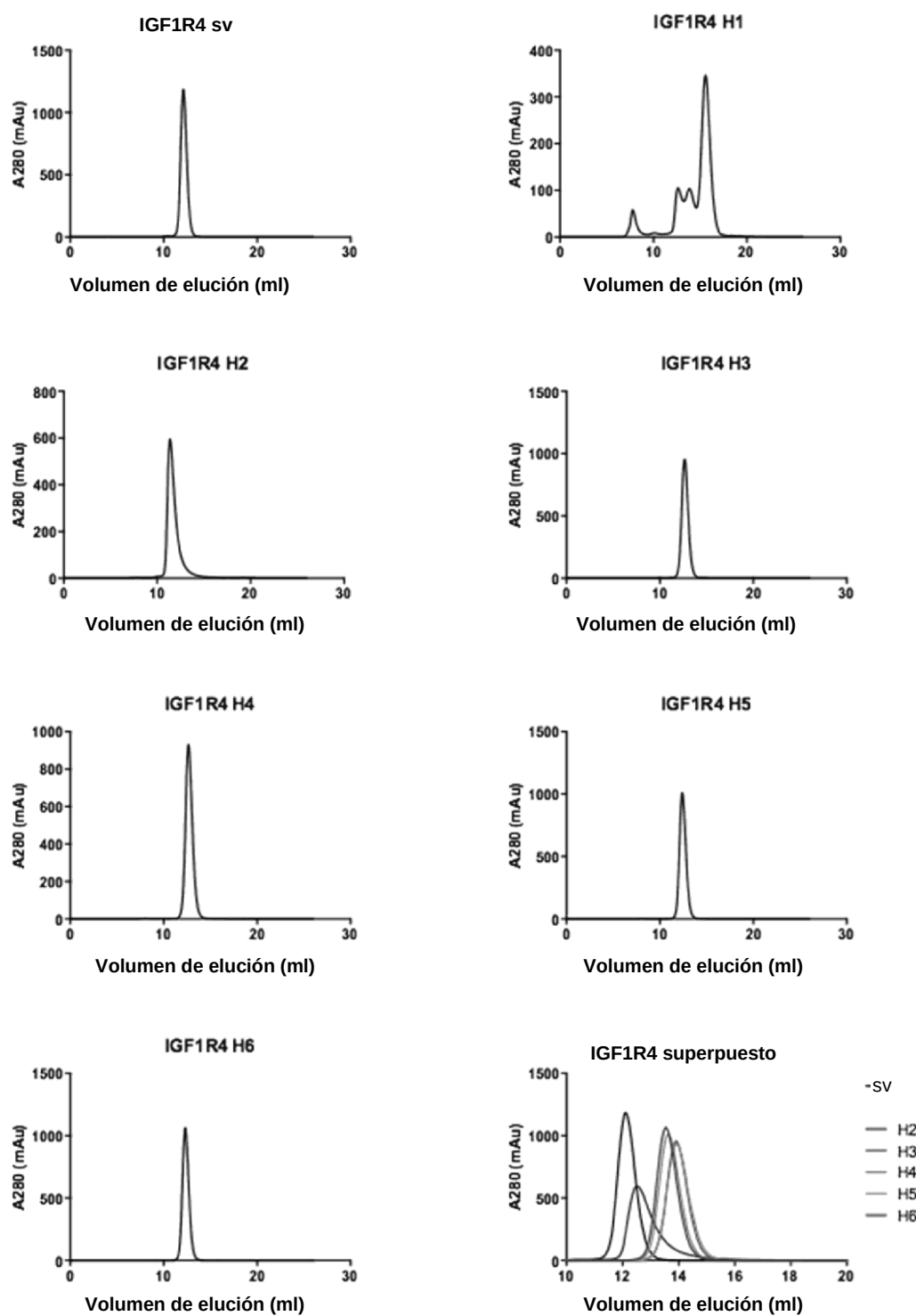


FIG. 3A

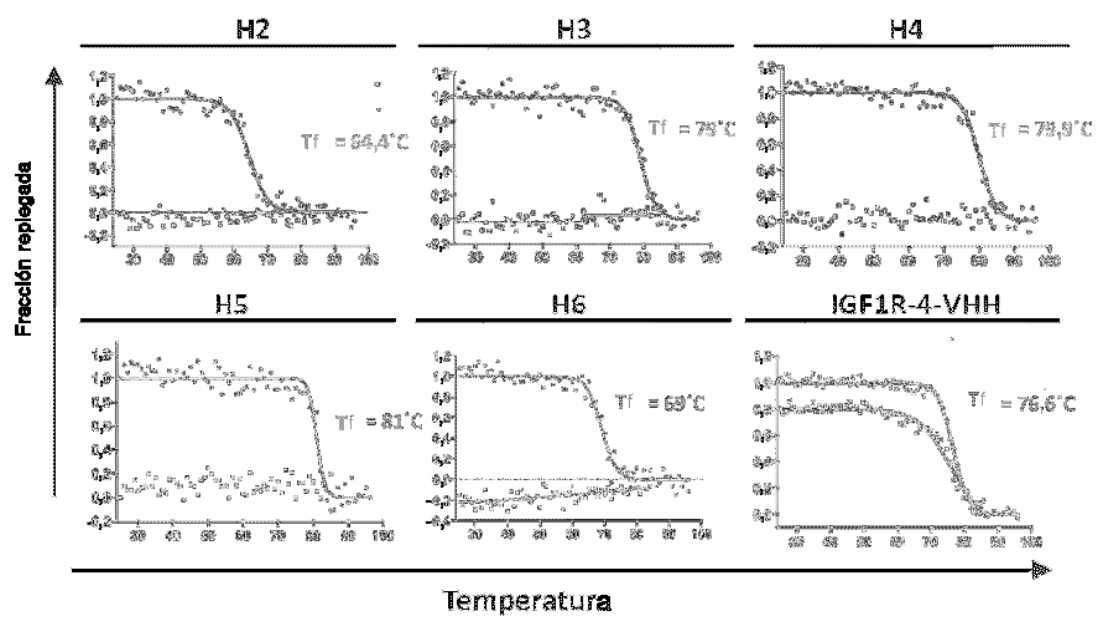


FIG. 3B

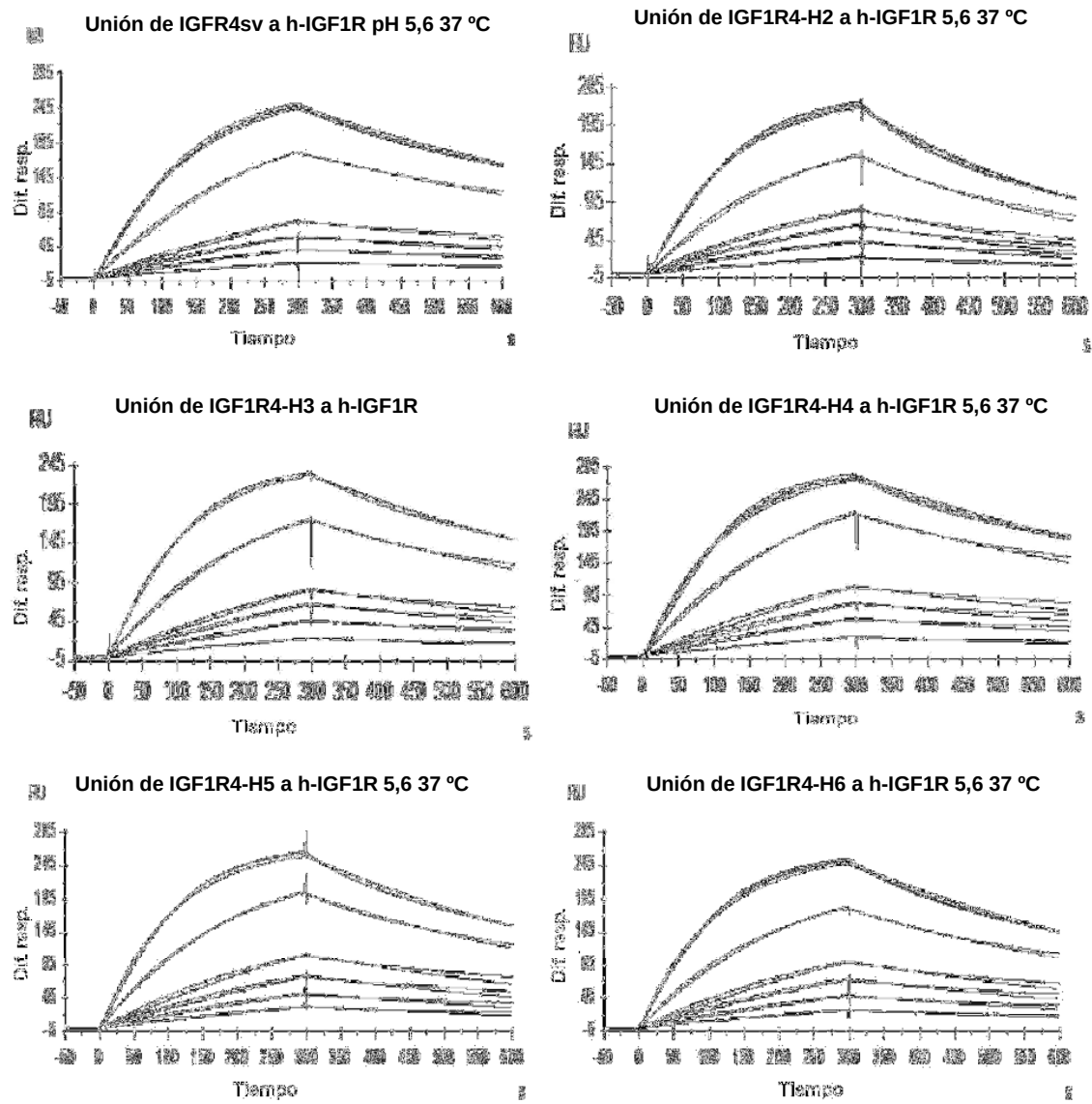


FIG. 3C

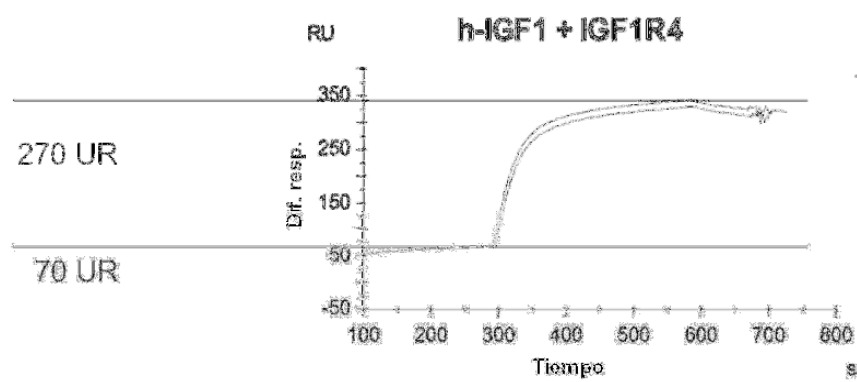


FIG 3D

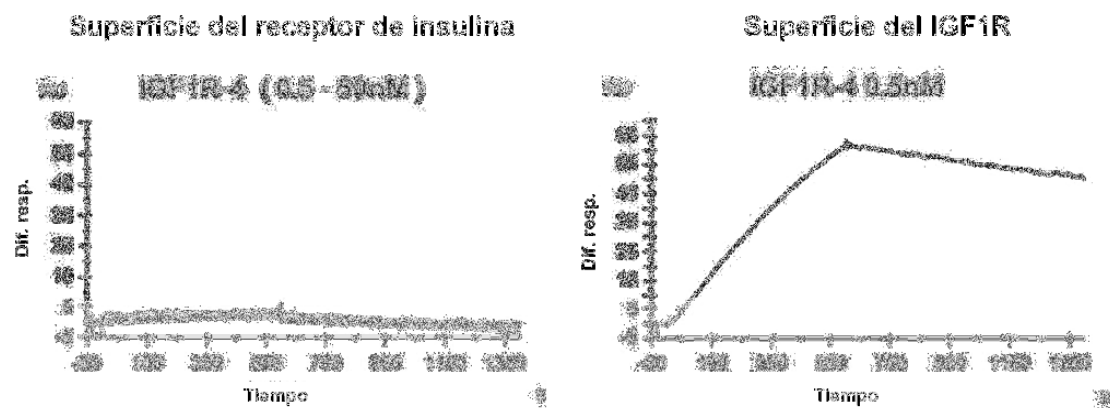


FIG 3E

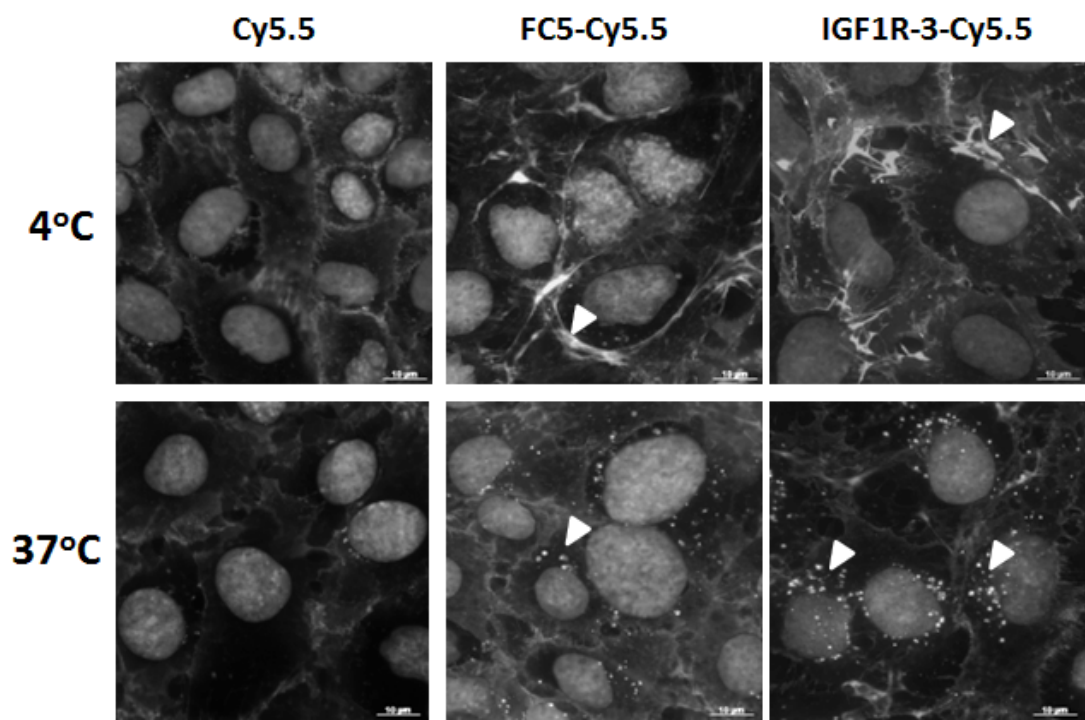


FIG. 4

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFVGHITWSRGTTTRVASS
VKDRFTISRDSAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSSMTVD
KKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMI SLTPKVTCVVVDVSEDDPDV
QISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISK
IKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSY
FIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

FIG. 5A

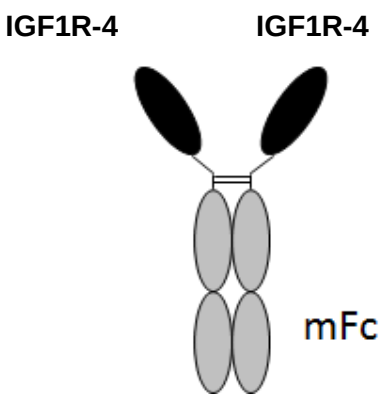


FIG. 5B

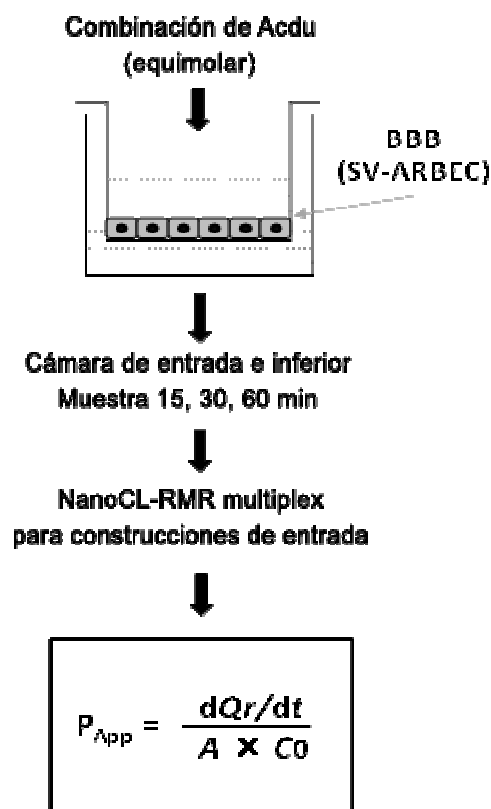


FIG. 6A

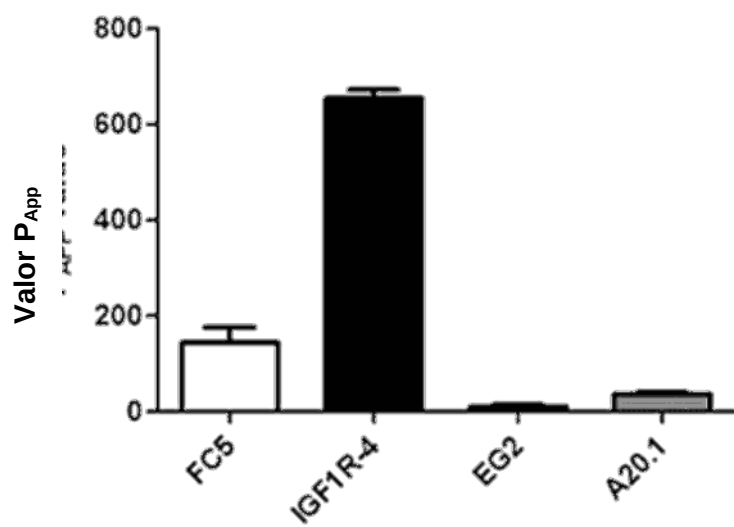


FIG. 6B

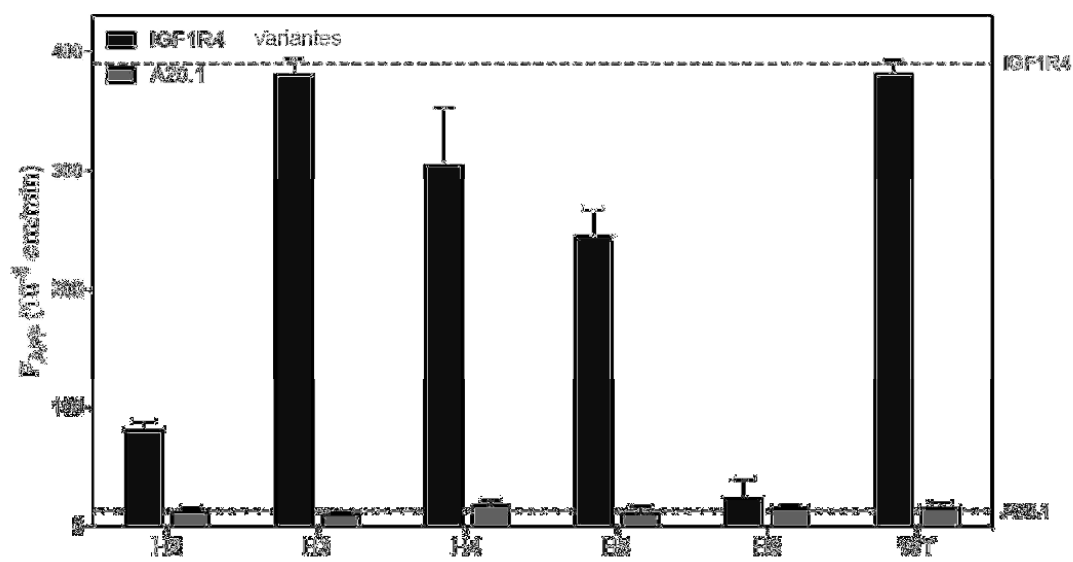


FIG. 6C

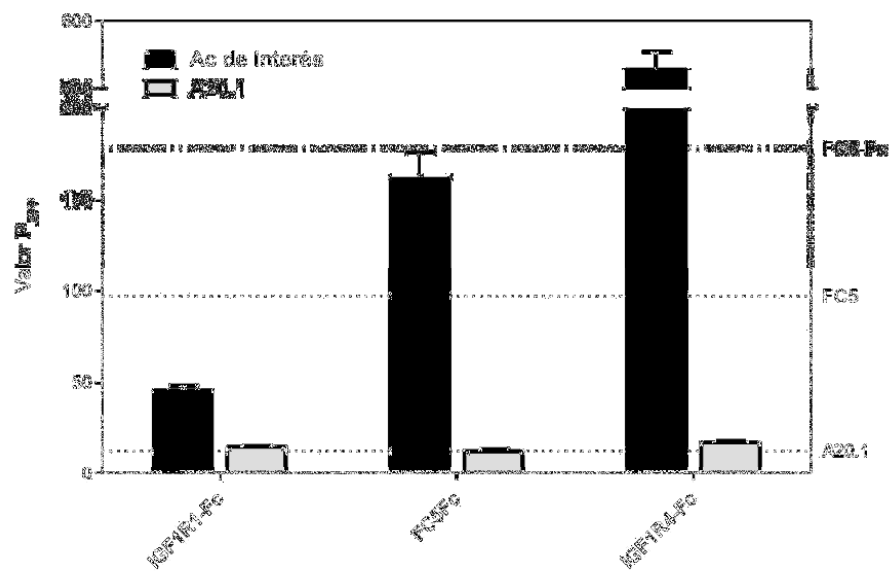


FIG. 6D

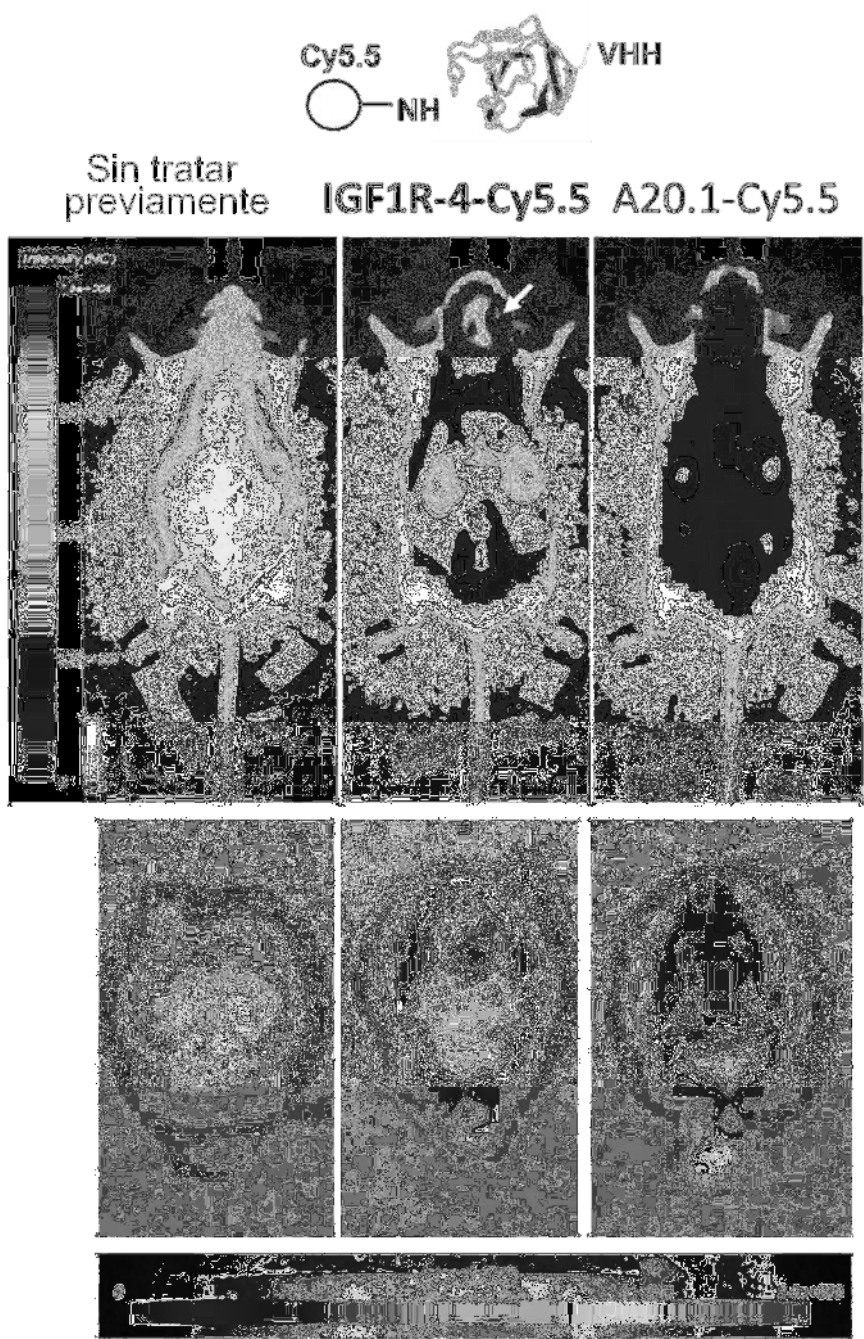


FIG. 7

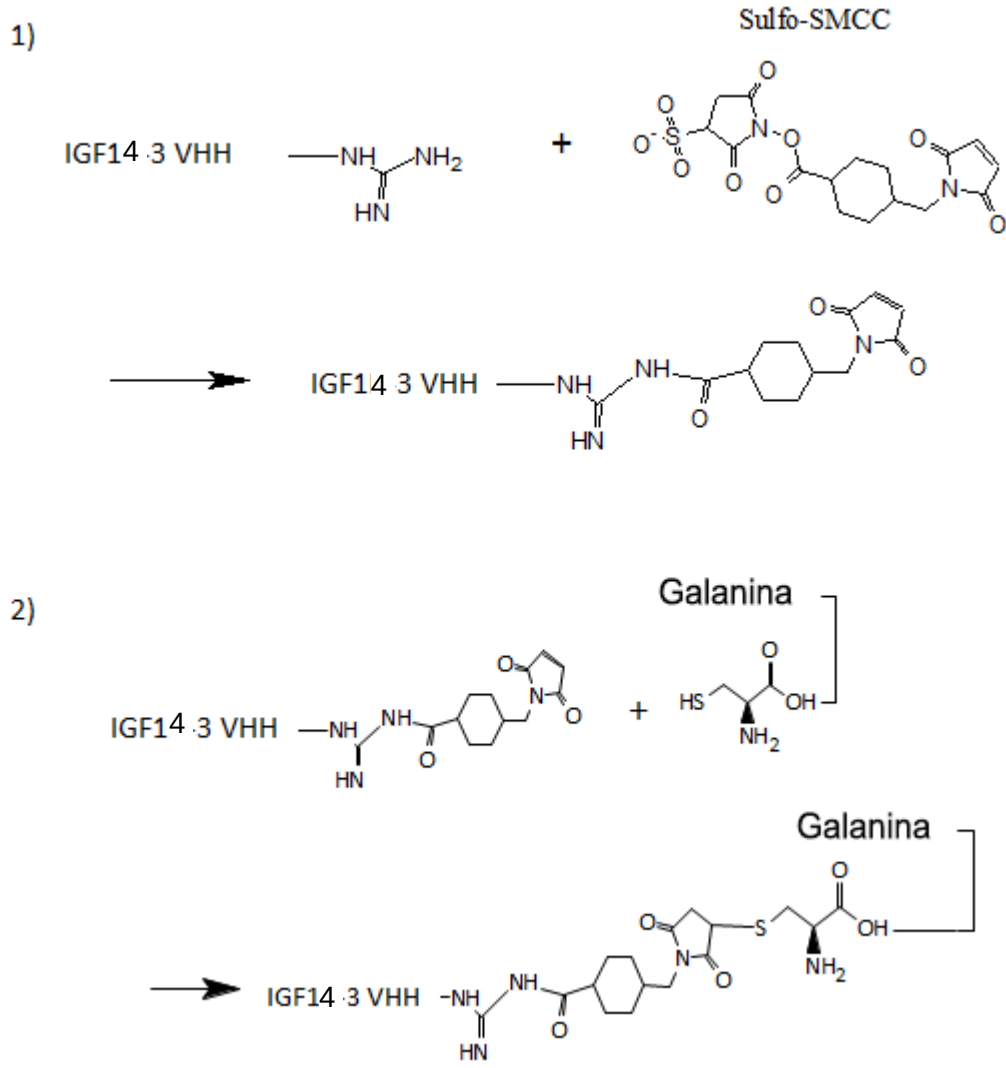


FIG. 8A

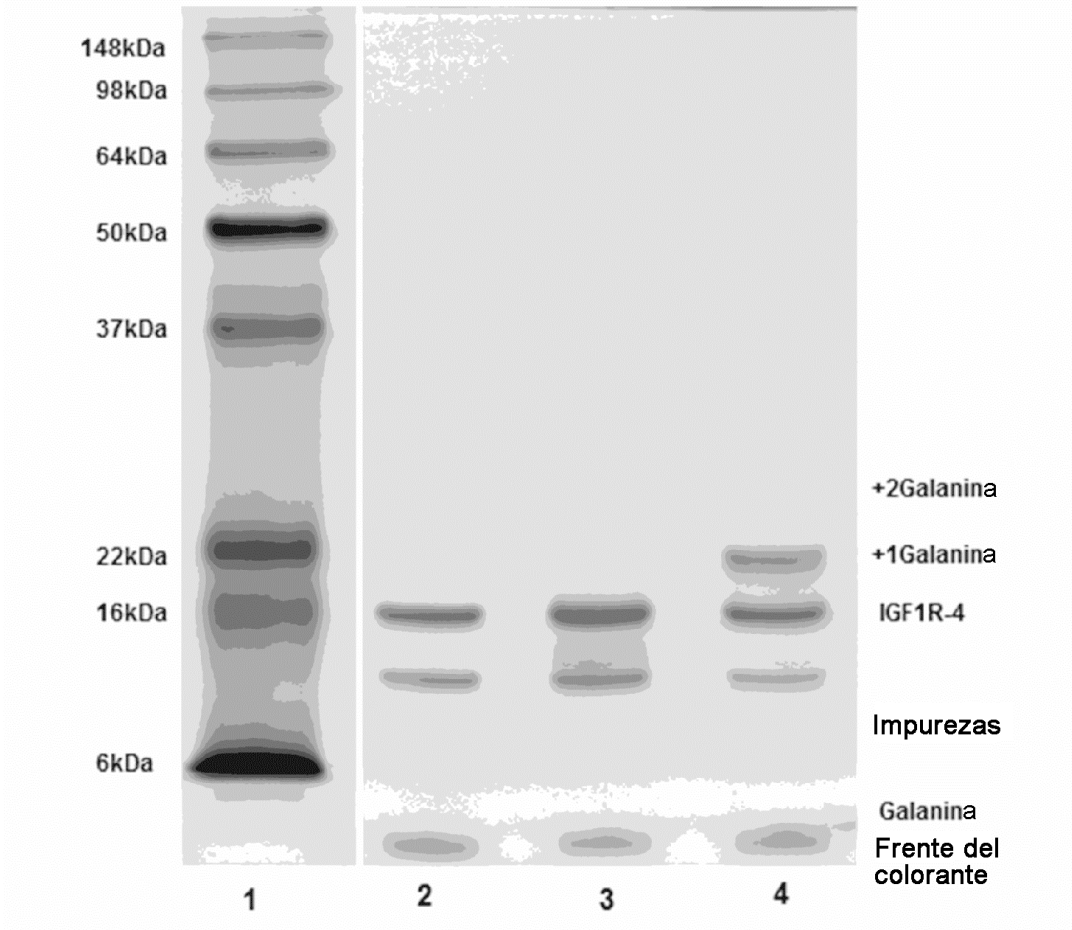


FIG. 8B

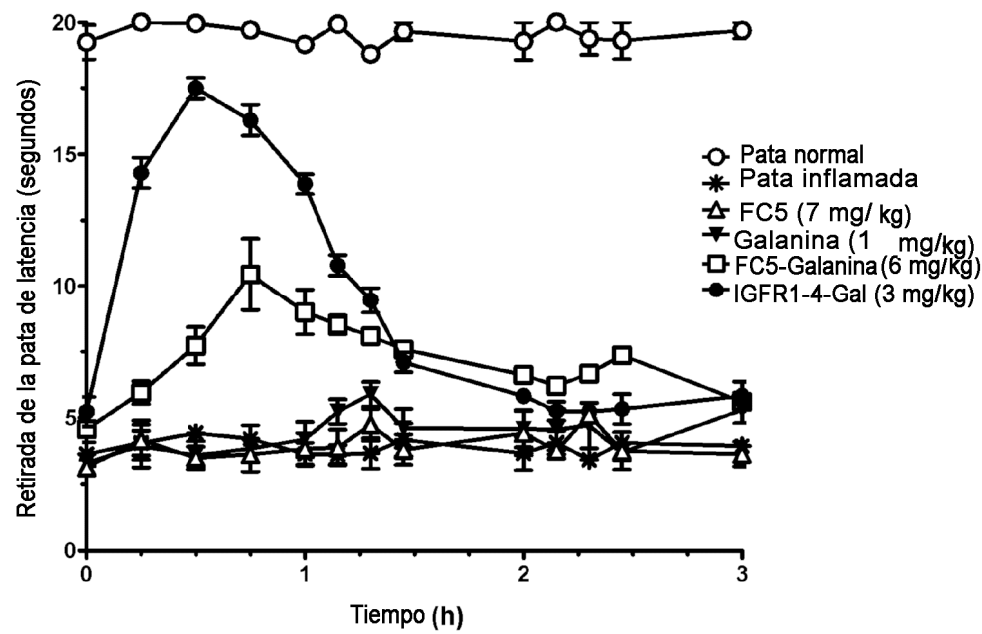


FIG. 9A

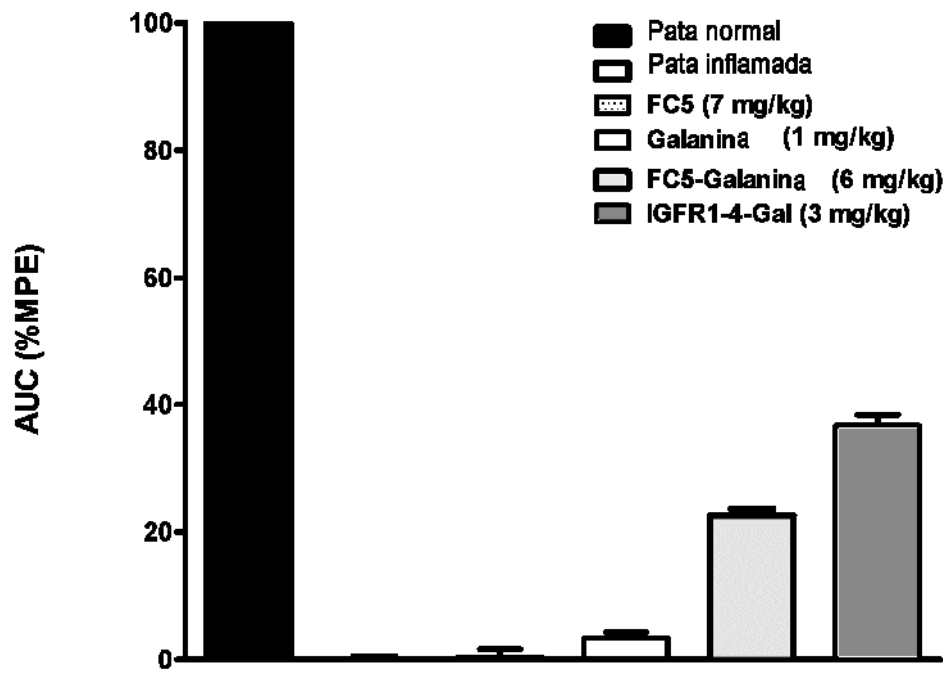


FIG. 9B

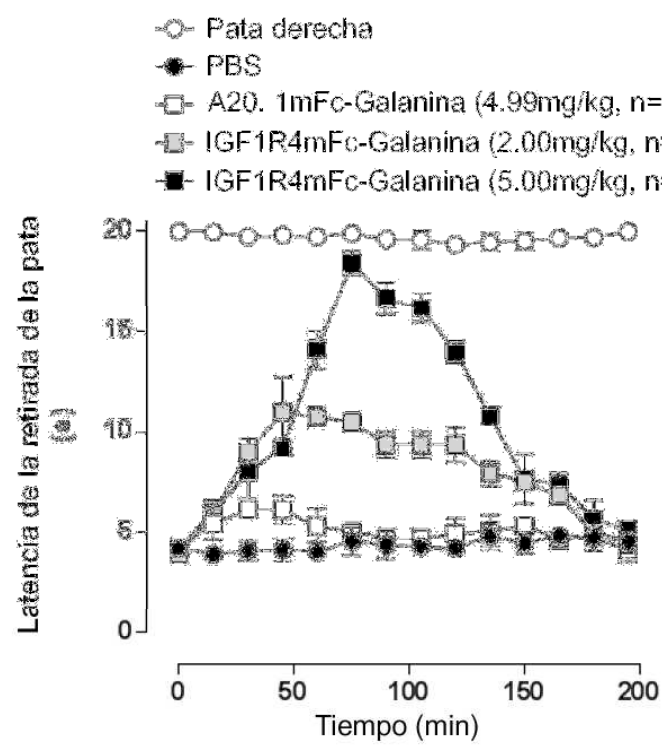


FIG 9C

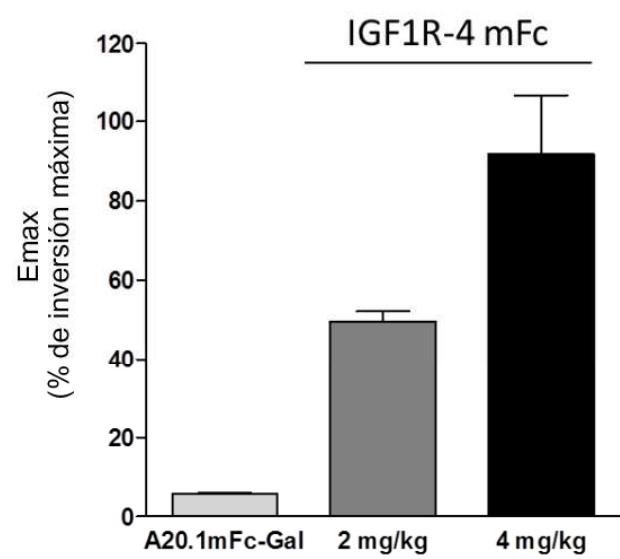


FIG 9D

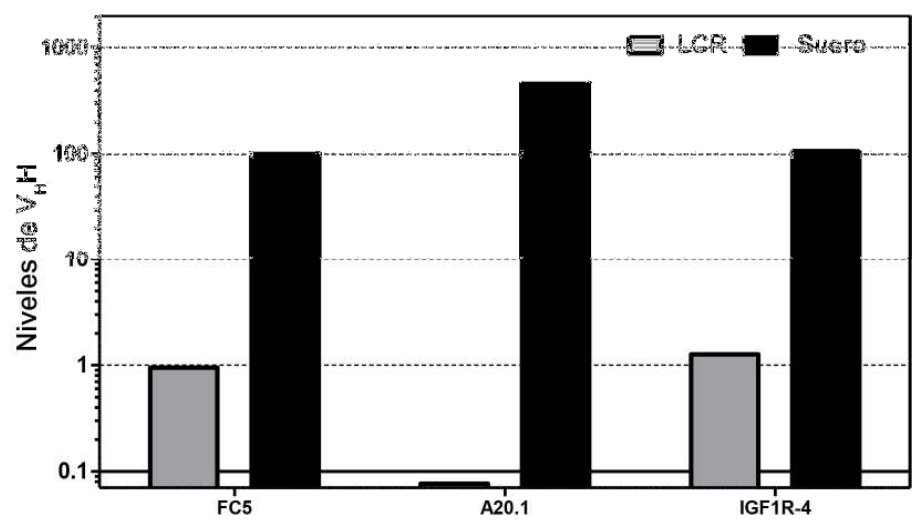


FIG 10.

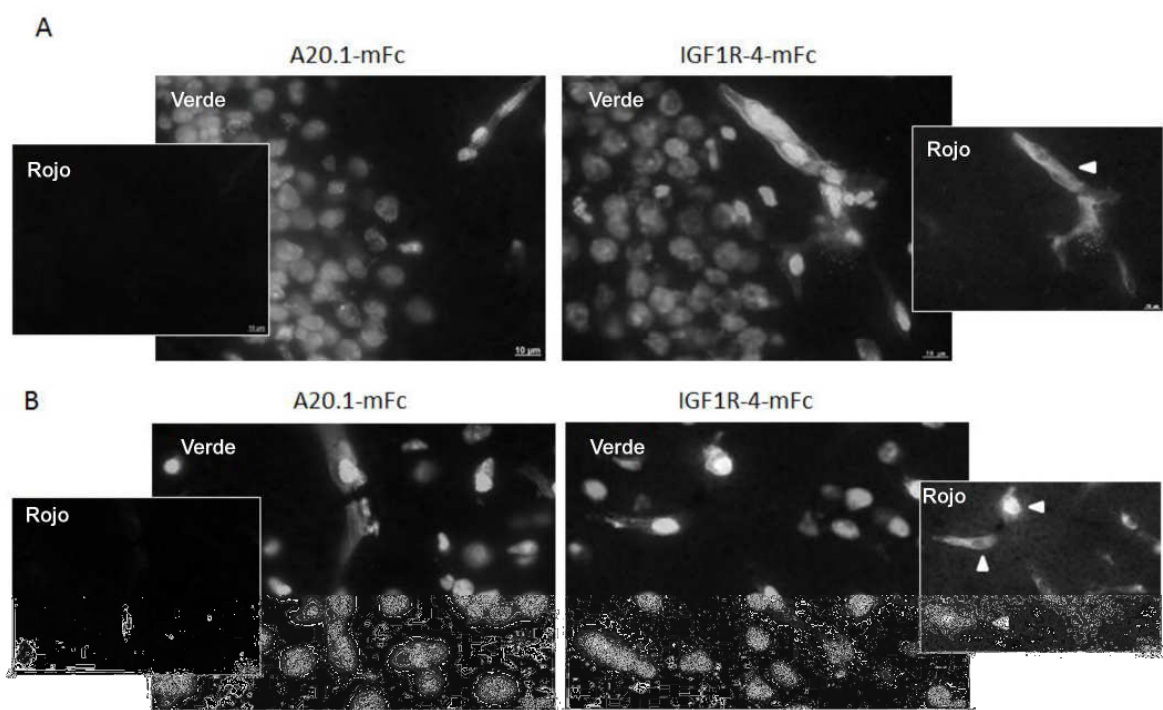


FIG. 11

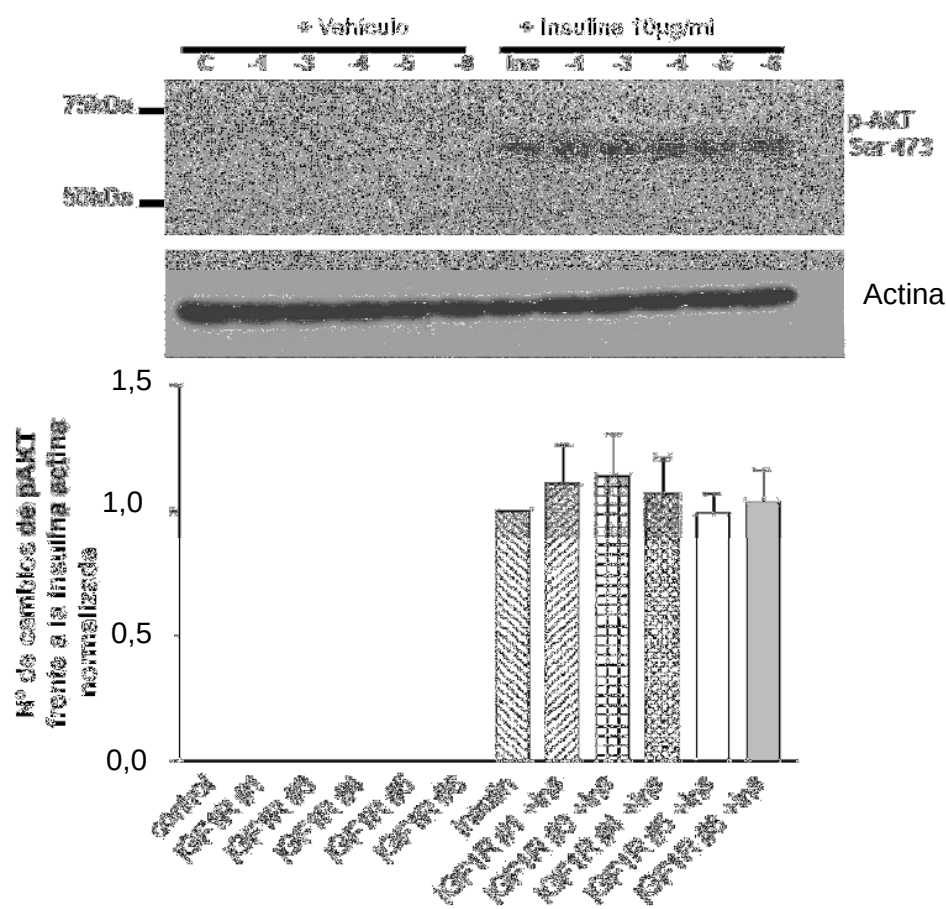


FIG. 12A

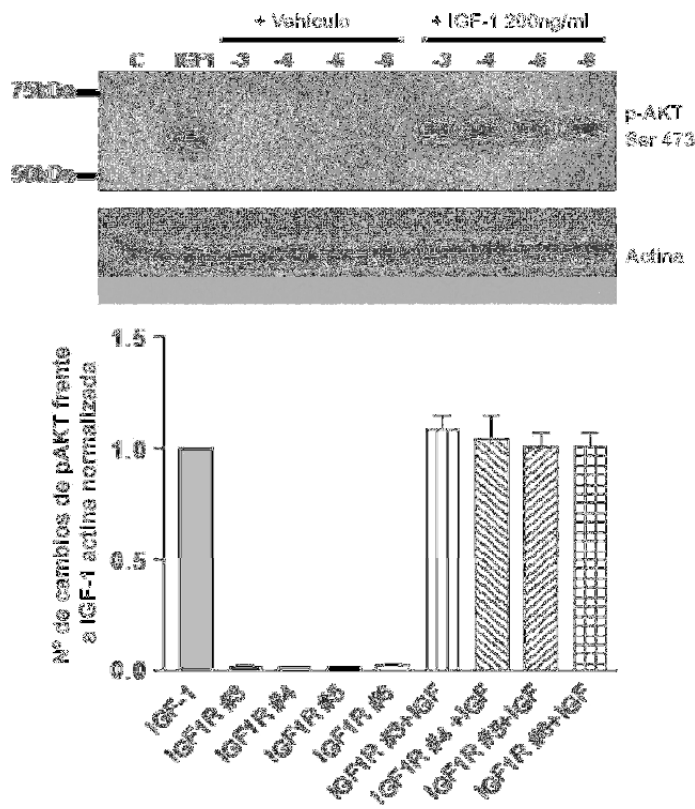


FIG. 12B

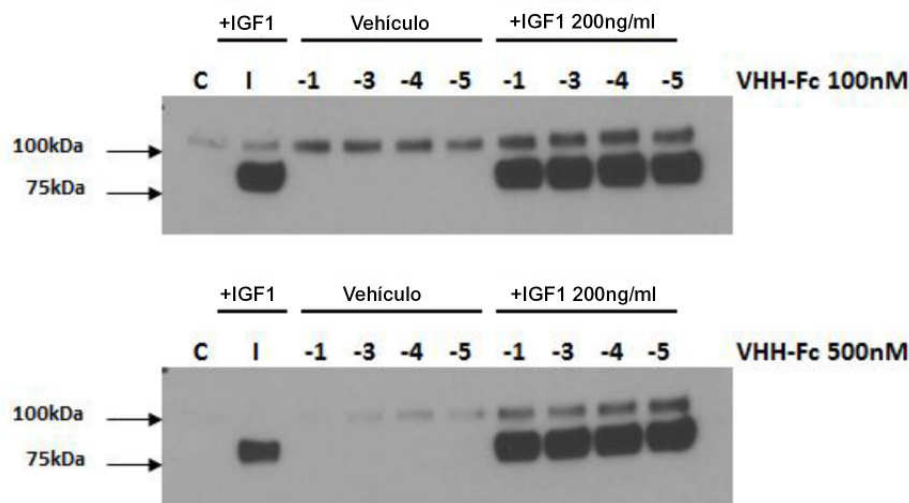


FIG. 12C