

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

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 la insulina 1 y fragmentos de los mismos que transmigran la barrera hematoencefálica, y a usos de los mismos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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 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 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 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

5 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

10 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).

15 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

20 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

25 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

30 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 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 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 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.

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 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

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).

20

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
 5 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
 anticuerpos específicos del receptor del factor similar a la
 insulina 1 y 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
 20 IGF1R y puede comprender la secuencia FENFLHNSIFVPR (SEQ ID
 NO:11) o fragmentos de la misma.

La presente invención proporciona además un anticuerpo
 aislado o purificado o fragmento del mismo, que comprende
 25 una secuencia de la región determinante de la
 complementariedad (CDR) 1 de GRTIDNYA (SEQ ID NO:1);
 una secuencia de CDR2 de IDWGDGGX (SEQ ID NO:
 2); donde X es A o T y
 una secuencia de CDR3 de AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID
 30 NO: 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). En una realización, el anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo
5 comprende una secuencia de CDR2 de IDWGDGGA.

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

10 X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGKX₆X₇EX₈
VX₉TIDWGDGGX₁₀RYANSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAV
YX₁₇CAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTX₁₈VTVSS (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 V o S; X₆ es D o G; X₇ es L o R; X₈ es F o W; X₉ es A
15 o S; X₁₀ es A o T; X₁₁ es A o S; X₁₂ es G o N; X₁₃ es M o
L; X₁₄ es N o R; X₁₅ es E o R; X₁₆ es P o A; X₁₇ es S o Y;
y X₁₈ es Q o L,

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

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREVFATID
WGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGTMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDV
ARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5), denominada en el
25 presente documento IGF1R-5;

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVSTIDW
GDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDA
RYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:6), denominada en el presente
documento IGF1R-5_H1;

30 VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATID
WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDA

ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:7), denominada en el presente documento IGF1R-5_H2;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKGLEFVATID
WGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNL DV

5 ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:8), denominada en el presente documento IGF1R-5_H3;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATID
WGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKGTMYLQMNSLRAEDTAVYSCAMARQSRVNL DV

ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:9), denominada en el presente documento IGF1R-5_H5; y

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVSTIDW
GDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNL DVA

RYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:10), denominada en el presente documento IGF1R-5_H5,

15 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. Los anticuerpos o fragmento del mismo pueden unirse a un epítipo que comprende la secuencia de FENFL HNSI FVPR (SEQ ID NO: 11).

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 ligado a un fragmento Fc; el fragmento Fc puede ser 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: 42 (denominada en el presente documento consenso-IGF1R-5-mFc), SEQ ID NO: 43 (denominada en el presente documento mFc-IGF1R-5) u 12 (denominada en el presente documento fusión mFc-IGF1R-5).

5

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

10 La presente invención también proporciona una molécula 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.
15

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

20

La presente invención proporciona además el anticuerpo 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
25 intervalo de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 200 kDa. 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
30 resto de hidrato de carbono, una enzima, un anticuerpo o fragmentos 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 fragmentos del mismo, una molécula basada en
 5 ADN, un vector viral, o un agente citotóxico; o uno o más de nanopartículas, nanohilos, nanotubos, o puntos cuánticos.

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

También se proporciona un método *in vitro* de detección
 15 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
- 20 b) detectar 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
 25 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,
 30 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
5 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
- 10 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
15 por emisión de positrones), SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único), imágenes de fluorescencia o cualquier otro método adecuado.

Actualmente se proporciona un método de transporte de una
20 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 describe en el presente documento unido a
25 la molécula de interés, en el que el anticuerpo aislado o purificado 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.

30 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 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, 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 intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.).

15

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 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 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 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 cualquier método adecuado conocido en la técnica. La cantidad

5 de LCR requerida para el método de proteómica dirigida en la etapa b) puede estar entre aproximadamente 1 a 10 μ l. Los métodos de proteómica dirigida usados para cuantificar la cantidad del uno o más de anticuerpo o fragmento del mismo unido a la molécula de carga puede ser cualquier método

10 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 marcada (RMR - SIIT)

15

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

20 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_{RH} de unión al IGF1R que proporciona una

25 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

30 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. Esta es la primera identificación y la demostración de un anticuerpo dominio de unión anti-IGF1R que transmigra la BHE por TMR. Se confirmó que V_HH del IGF1R se unía al IGF1R (Fig. 2B), se internaliza en las células de la BHE (Fig. 4), y cruzan al lado abluminal del modelo de BHE *in vitro* (Fig. 5B). 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. 7A y B; Fig. 9).

15

Los resultados también muestran que el VHH anti-IGF1R puede expresarse en fusión con el fragmento Fc (fragmento cristalizable) 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 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 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, citoquinas, trampas de receptores) a través de la BHE.

5 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 los tratamientos a medio plazo (por ejemplo, cáncer) y a largo plazo (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o
10 Parkinson).

Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a la vista de la descripción siguiente. Las descripciones y ejemplos detallados, aunque indican
15 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 evidentes para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de la presente invención.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Estas y otras características de la invención se describirán a continuación a modo de ejemplo, con referencia
25 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
30 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 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, 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 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 minúscula en cursiva. El péptido señal se muestra en negrita y cursiva. El supuesto epítipo al que IGF1R-5 V_HH podría unirse está subrayado.

La figura 3A muestra un cromatograma de exclusión por tamaño de la unión a IGF1 R de V_HH IGF1R-5, a través de una columna Superdex 75. El perfil sugiere que este V_HH es monomérico y no agregante. La Figura 3B muestra la temperatura de fusión (T_f) según se determina mediante dicroísmo circular (CD) para IGF1R-5 V_HH y sus variantes humanizadas (5H1, 5H2, 5H3, 5H5, 5H6 marcadas). Las proteínas se calentaron por encima de 90 °C y las mediciones se tomaron en el instrumento CD para determinar la curva de fusión

(círculos negros o rellenos) y la T_f . Posteriormente, las proteínas se enfriaron a temperatura ambiente, se calentaron una vez más y se analizaron por CD (curva gris o cuadrados). Esto permitió la determinación de la fracción de la proteína replegada. La Figura 3C muestra una superposición de sensograma de resonancia de plasmón superficial (SPR) para la unión de IGF1R-5 $V_{HH}0,1$ - 10 nM y sus variantes humanizadas (5H1, 5H2, 5H3, 5H5, 5H6 marcadas) a la porción extracelular recombinante del fragmento del IGF1R humano (h-IGF1R). Los datos obtenidos con este método específico y experimental establecieron un ajuste bien a un modelo 1:1, dando valores de K_d en el rango bajo nanomolar (nM) (0,6 - 16.4nM), como se detalla en la Tabla 2. La Figura 3D muestra sensogramas de SPR de IGF1R-5 de unión a la porción extracelular recombinante del fragmento de IGF1R humana y la posterior adición de IGF1, que puede unirse simultáneamente al receptor de VHH. El experimento se repitió dos veces, como se muestra en el gráfico.

La Figura 4 muestra resultados de imagen de la captación celular de IGF1R-5 V_{HH} marcado con Cy-5,5 y de V_{HH} control. IGF1R-5 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-5 se internaba de forma pasiva (4 °C) 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-5 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 5-V_HH se acumuló
 5 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.

10 La Figura 5A muestra la secuencia para la fusión C-terminal de IGF1R-5 VHH con el fragmento Fc de murino (IGF1R-5-MFC) mientras que la Figura 5B muestra la secuencia de fusión N-terminal (MFC-IGF1R-5-Gal). Una representación esquemática de la proteína de fusión ensamblada se muestra en
 15 la Figura 5C. El IGF1R-5 V_HH se muestra en negro y el Fc murino (CH2 y CH3) se muestra en gris en la Figura 5 A-C.

La Figura 6A es un diagrama de flujo que resume el uso del modelo de BHE *in vitro* para evaluar la capacidad de
 20 diversos V_HH para cruzar la BHE. Cantidades equimolares (5,6 µM o 1,25 µM) 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-5 se analizaron simultáneamente por su capacidad para cruzar la
 25 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.
 30 Después de co-adición de cantidades equimolares de los diversos VHH a la cara luminal del modelo de BBB, se tomaron

muestras de la cámara inferior después de 15, 30 y 60 min. Las concentraciones de cada V_{HH} fueron cuantificados mediante la espectrometría de masas (monitorización de reacción múltiple - las normas internas de isotipo marcado; GRM-SIIT) 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; C_0 = 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-5 tiene un valor P_{app} similar a FC5, mientras que los controles negativos tienen ambos valores de P_{app} muy bajos, lo que indica un transporte facilitado de FC5 y IGF1R-5 V_{HH} en comparación con el transporte inespecífico muy bajo o el transporte paracelular de V_{HH} de control. Los resultados son los valores promedio de P_{app} obtenidos en 5-6 experimentos independientes. La Figura 6C muestra los valores de P_{app} de los anticuerpos humanizados de u solo dominio de IGF1R-5 (H1, H2, H3, H5, H6) (barras negras) en comparación con A20.1 V_{HH} (barras blancas), que se analizó como control en el mismo pocillo (el valor promedio de FC5 Y A20.1 se indica mediante una línea de puntos de color gris. La Figura 6D muestra los valores de P_{app} de la fusión en N-terminal y C-terminal de IGF1R-5 V_{HH} a Fc de ratón (gris claro), en comparación con el Fc de ratón A20.1 (A20.1mFc) (gris oscuro), que se analizó en el mismo pocillo que el control y tiene un valor de P_{app} muy bajo. Los valores promedio de P_{app} FC5-Fc (FC5 fusionado a un Fc), FC5 (VHH), IGF1 R-5 (VHH) y A20.1 (VHH) se indican mediante líneas de puntos para la comparación.

La figura 7 muestra el esquema para la síntesis química del conjugado IGF1 R-5 V_HH-galanina. El IGF1R-5 se conjugó primero al grupo NHS de un reticulador sulfo-SMCC (1); después, IGF1R-5-sulfo-SMCC activado por maleimida se
 5 conjugó con la cisteína de galanina reducida (2).

La Figura 8 muestra la liberación en el cerebro mediada por IGF1R-5 del péptido conjugado químicamente galanina. La Figura 8A es un gráfico que muestra la capacidad de IGF1R-5
 10 para liberar dosis farmacológicamente eficaces del péptido analgésico conjugado 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
 15 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
 20 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
 25 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 3 mg / kg de galanina (círculos sólidos de color gris). La inyección sistémica del conjugado IGF1R-5-galanina
 30 (2,93 mg / kg o 5,85 mg/kg) indujo un efecto analgésico dependiente de la dosis en un período de 3 horas, más

pronunciada que el observado con 6 mg / kg de conjugado FC5-galanina. La Figura 8B muestra estos resultados como el área bajo la curva (AUC) de la respuesta farmacodinámica en comparación con el efecto máximo posible (MPE; pata control).

5 2,93 mg / kg de IGF1R-5-galanina indujeron un 28% de MPE, mientras que 5,85 mg/kg de IGF1R-5-Galanina indujeron un 55 % de MPE durante un período de 3 horas, lo que demuestra una penetración significativa del conjugado en el cerebro en comparación con la galanina individualmente después de la

10 inyección sistémica (<5 % de MPE). La figura 8C es un gráfico que muestra la capacidad de la MFC-IGF1R-5-Gal para suprimir la hiperalgesia térmica en Hargreaves modelo de dolor después de la inyección intravenosa diferentes concentraciones. La figura 8D muestra una respuesta

15 dependiente de la dosis (por ciento de la inversión en el pico de respuesta) de la hiperalgesia térmica en el modelo de Hargreaves después de la inyección iv de cualquiera de IGF1 R-5-MFC-Gal o MFC-IGF1 R-5-Gal conjugado.

20 La Figura 9 muestra la farmacocinética en plasma y en el LCR de IGF1R-5-mFc y V_HH control, fusión de Fc A20.1 de ratón (A20.1-mFc) después de la administración sistémica (vena de la cola) de 5 mg / kg. Se introdujo una cánula en la *cisterna magna* para extracciones en serie de LCR (1 - 48 horas). Los

25 niveles en plasma y en LCR de IGF1R-5-mFc 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 muestras de LCR que tienen

30 una relación en plasma / LCR menor de 1.500 fueron excluidas como potencialmente contaminadas con sangre. La semivida

plasmática de IGF1R-5-mFc y A20.1 fue similar (23 h y 25 h, respectivamente). La relación de plasma / LCR fue de 2 % y 0,04 \$ para IGF1R-5-mFc y A20.1-mFc, respectivamente, 24 horas después de la inyección sistémica de la proteína de fusión.

La Figura 10 muestra inmunodetección de IGF1R-5mFc en secciones de cerebro 48 horas después de la administración en la vena de la cola de una dosis de 5 mg / kg. Se llevó a cabo perfusión de sacrificio con PBS en las ratas y se obtuvieron secciones de cerebro (35 μ m) utilizando el vibratomo. IGF1R-5-mFc se inmunodetectó utilizando un anticuerpo anti-Fc de ratón. Los vasos sanguíneos en la sección de la corteza se detectaron utilizando lectina RCA 1 (parte superior izquierda). Se detectaron los astrocitos en la misma sección por un anticuerpo contra la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) (parte superior derecha). Se pudo detectar IGF1R-5mFc en ambos vasos y fuera de los vasos (es decir, en el parénquima cerebral, transmigrado a través de la BHE) (inferior izquierda) como indican las puntas de flecha. Una micrografía compuesta de todas las tinciones se muestra en la parte inferior derecha, lo que indica la trans migración de IGF1R-5-MFC desde el lado luminal del vaso sanguíneo, a través de la BBB en el parénquima cerebral.

25

La Figura 11 muestra que IGF1R-5 no interfiere con la insulina o IGF-1 de señalización a través del receptor de la insulina o IGF1R. La Figura 11A es una transferencia de tipo Western representativa que muestra que ni IGF1R-5, ni ninguno de los demás anti-IGF1R V_HH analizados (IGF1R-1, -3, -4 o -6) induce la fosforilación de Akt aguas abajo solo a una

concentración de 100 nM. Tampoco la presencia de 100 nM de IGF1R-5, o cualquiera de los otros V_HH anti-IGF1R inhiben la fosforilación de Akt inducida por 10µg / ml de insulina. La cuantificación de las densidades de la banda de

5 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 11B es una transferencia de tipo Western representativa que muestra que ni IGF1R-5, ni ninguno de los demás V_HH anti-IGF1R

10 analizados (IGF1R -4, -4 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

15 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 11C muestra transferencias de tipo Western en sondas para IGF1R fosforilado. Las células se incubaron con 100 nM o 500 nM de

20 IGF1R-5, o cualquiera de los otros V_HH anti-IGF1R (IGF1R-1, -3 o -4) fusionados en su extremo C-terminal a un Fc murino (por ejemplo, IGF1R-5-mFc) solo o se estimularon con 200 ng / ml de IGF-1 en presencia de las respectivas proteínas de fusión IGF1R-V_HH-mFc. Las transferencias de tipo Western

25 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 INVENCIÓN

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
 5 a anticuerpos específicos del receptor del factor similar a
 la insulina 1 o 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 epítopo del receptor del factor 1 de
 crecimiento similar a la insulina (IGF1R), en el que el
 anticuerpo o fragmento del mismo transmigra la barrera
 hematoencefálica y en el que el epítopo está unido
 15 específicamente por el anticuerpo de SEQ ID NO:5. El epítopo
 del IGF1R puede estar en el dominio extracelular del IGF1R y
 puede comprender la secuencia FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO:11) o
 fragmentos de la misma.

20 La presente invención proporciona además un anticuerpo
 aislado o purificado o fragmento del mismo, que comprende
 una secuencia de la región determinante de la
 complementariedad (CDR) 1 de GRTIDNYA (SEQ ID NO:1);
 una secuencia de CDR2 de IDWGDGGX (SEQ ID NO:
 25 2); donde X es A o T y
 una secuencia de CDR3 de AMARQSRVNLDVARYDY (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). En una realización, el

anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo comprende una secuencia de CDR2 de IDWGDGGA.

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 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 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 antígeno (Fv). Cada dominio tiene una estructura bien establecida familiar para los expertos en la técnica.

20

Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son responsables de la unión al antígeno diana y, por lo 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 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

30

hipervariables, tres cada uno por región 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. definen las "regiones 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.

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 aislados de reservas de V_H , V_{HH} , V_L , o V_{NAR} de cualquier origen

5 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 a través de la modificación adicional de dichos Acdu mediante humanización, maduración de la afinidad, estabilización,

10 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 unión al antígeno y la especificidad de los Acdu.

15 Los Acdu poseen propiedades deseables para las moléculas de anticuerpo, tales como alta estabilidad térmica, alta resistencia a los detergentes, resistencia a las proteasas relativamente alta (Dumoulin et al, 2002) y un alto rendimiento de producción (Arbabi-Ghahroudi et al, 1997);

20 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 afinidad *in vitro* (Davies & Riechmann, 1996). Las modificaciones adicionales para aumentar la estabilidad,

25 tales como la introducción de enlaces disulfuro no canónicos (Hussack et al, 2011; Kim et al, 2012), también puede llevarse a los Acdu.

Un experto en la técnica estará muy familiarizado con

30 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 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: 14), 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.

10

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

5 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 otras regiones de marco del fragmento de anticuerpo (Fv, scFv, Fab) o a otras proteínas de tamaño y naturaleza similares

10 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 afinidad y la especificidad del Acdu por su diana (es decir, IGF1R) es probable que se vean mínimamente afectadas. El

15 injerto de CDR se conoce en la técnica y se describe en, al menos, los siguientes documentos: patente de Estados Unidos n.º6180370, patente de Estados Unidos n.º5693761, patente de Estados Unidos n.º6054297, patente de Estados Unidos n.º5859205, y patente europea n.º 626390. El recubrimiento,

20 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 residuos no humanizados enterrados, que pueden ser importantes para la conformación de CDR, se conservan,

25 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 describe en, al menos, los siguientes documentos: patente de Estados Unidos n.º5869619, patente de Estados Unidos

30 n.º5766886, patente de Estados Unidos n.º5821123, y patente europea n.º 519596. Los expertos en la técnica también

estarán ampliamente familiarizados con los métodos de preparación de tales fragmentos de anticuerpos humanizados y la humanización de las posiciones de aminoácidos.

5

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

X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGKX₆X₇EX₈

10

VX₉TIDWGDGGX₁₀RYANSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLQMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAV

YX₁₇CAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈VTVSS (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 V o S; X₆ es D o G; X₇ es L o R; X₈ es F o W; X₉ es A

o S; X₁₀ es A o T; X₁₁ es A o S; X₁₂ es G o N; X₁₃ es M o

15

L; X₁₄ es N o R; X₁₅ es E o R; X₁₆ es P o A; X₁₇ es S o Y;

y X₁₈ es Q o L,

o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

Como alternativa, el anticuerpo aislado o purificado puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste

20 en:

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATID

WGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGTMYLQMNPLEPDTAVYSCAMARQSRVNLDV

ARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5), denominada en el

presente documento IGF1R-5;

25

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVSTIDW

GDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDA

RYDYWGQGT₁₈VTVSS (SEQ ID NO:6), denominada en el presente

documento IGF1R-5_H1;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATID

30

WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDA

ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:7), denominada en el presente documento IGF1R-5_H2;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKGLEFVATID
WGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNL DV

5 ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:8), denominada en el presente documento IGF1R-5_H3;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATID
WGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKGTMYLQMNSLRAEDTAVYSCAMARQSRVNL DV

ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:9), denominada en el presente documento IGF1R-5_H5; y

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVSTIDW
GDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNL DVA

ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:10), denominada en el presente documento IGF1R-5_H5,

15 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 considerarían 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.

5

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 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 una enlace en el cual el par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene más estrechamente por uno de 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 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 (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).

5 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 las posiciones de residuos. Cualquier método conocido puede
10 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
15 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.

20 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
25 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
30 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.

5

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, 15 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 WO 95/04069 o Voges et al en el documento WO / 20 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.

25 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 30 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 WO2003 / 046560, en el que se producen pentacuerpos mediante la expresión de una proteína de fusión que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo

5 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

10 "combody", es una fusión del anticuerpo o fragmento de la presente invención con un péptido superenrollado que da lugar a una molécula multimérica. Otras formas de presentación multivalente también están abarcadas por la presente invención. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, el

15 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),

20 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

25 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 mlimitaciones a las mismas, IgG1, IgG2, etc. En este abordaje el gen de Fc en se

30 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 abarcar formatos quiméricos de anti-
5 IGF1R-5 V_HH unidos a un dominio Fc o fusiones de anticuerpos bi- o tri-específicos con dos o tres anti-IGF1R-5 V_HH que reconocen epítomos únicos. Tales anticuerpos son fáciles de diseñar y de producir, se puede extender considerablemente la semivida en suero de los Acdu y pueden ser excelentes
10 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
15 en la técnica. El fragmento Fc puede proceder de cualquier fuente adecuada; por ejemplo, el Fc puede ser de 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). En un ejemplo
20 específico no limitante, el anticuerpo aislado o purificado multimerizado o fragmento como se acaba de describir puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 42, 43, 12, o 13.

Cada subunidad de los multímeros descritos anteriormente
25 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 o fragmento de anticuerpo mediante un enlazador, según sea
30 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 anticuerpo.

5 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 cuerpo por un tejido endotelial especializado conocida como la barrera hematoencefálica (BHE). Las células endoteliales
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

10

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 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 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), 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.

30

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

5 mediante 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,

10 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

15 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

20 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

25 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

30 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
 5 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
 10 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
 15 detectar por métodos de imagen. El anticuerpo o fragmento
 del mismo pueden estar unidos a la molécula de carga usando
 cualquier método conocido en la técnica (tecnología
 recombinante, la conjugación química, etc.).

20 La molécula de carga como se describe en el presente
 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
 25 de carga puede estar unida al péptido mediante un enlace
 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,
 30 tales como bacterias, levaduras o sistemas basados en células
 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
5 experto en la 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
10 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
15 no limitante, el anti-IGF1R-5 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.

20

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
25 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
30 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
5 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,
10 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,
15 enzima IA (EIA), ELISA, "captura rápida de antígeno", "cromatografía rápida" y "EIA rápido". (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).

20 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
25 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
30 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:

- 15 • Imágenes ópticas;
- 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;
- 20 • Tomografía computarizada por emisión de fotón único (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, 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.
- 25

• Ecografía o ultrasonidos con contraste (CEUS), en la que el agente detectable es al menos una microburbuja 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 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 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 transmigra 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.

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
5 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
10 fragmentos de los mismos específicos del IGF1R (el mismo epítipo o uno diferente).

La composición también puede comprender un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. El
15 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 composición y no es perjudicial para el receptor de la
20 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 comprimido. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, cuando
25 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 efectúa en un tampón a un pH adecuado para asegurar la
30 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 polvo seco puede comprender sacarosa o trehalosa. En un ejemplo específico no limitante, la
 5 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 liberación u otras tecnologías adecuadas para la administración del anticuerpo o fragmento
 10 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
 15 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 como se describe en el presente documento, comprendiendo el método

- 20 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 o fragmento del mismo en el
 25 LCR.

La molécula de carga puede ser cualquier molécula deseada, incluyendo las moléculas de carga, como se han descrito anteriormente; el anticuerpo aislado o purificado o
 30 fragmento del mismo transmigra 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 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 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 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 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 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 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 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.

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 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: 14). 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: 15; 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:16)

5' -GCTCTAGATCAGAAGTTTTTCATATCCTGTTTTGG-3' (inverso;

5 SEQ ID NO:17)

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
10 (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
15 (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
20 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
25 uso.

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
30 respectivas utilizando un protocolo descrito previamente
(Gaillet B. et al. 2010). En pocas palabras, 0,5-1,0 X 10⁵

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
 5 suspensión de LV recién preparada se añadió a las células 4 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
 10 utilizando el mismo protocolo después de 3-4 días de la recuperación celular. . Finalmente se expandieron las células en placas de 6 pocillos y matraces de agitación.

Producción y purificación de proteínas a gran escala. El
 15 clon identificado como el mayor productor se amplió en 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
 20 centrifugación y los sobrenadantes se filtraron y se concentraron (10x) usando los sistemas de flujo tangencial de filtración (cassetes de ultrafiltración Pellicon, EMD Millipore).

25 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
 30 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
 5 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).

10 **Ejemplo 2: Inmunización de llama y respuesta en suero**

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.

15

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
 20 PBS a 1 ml junto con 1 ml de adyuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO). Se realizaron tres inyecciones 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
 25 día 77. Se extrajo sangre pre-inmune antes de la primera inyección el día 1 y sirvió como control negativo. Se recogió 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
 30 se diluyó 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se purificaron las PBMC de la sangre con el tubo de

Lymphoprep (Axis Shield). Las células se contaron y se almacenaron como alícuotas de aproximadamente 1×10^7 células a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso futuro.

5 Se analizó el suero total pre-inmune y post-inmune para 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
10 (HCAb) y G2 (cIgG) analizaron para determinar la unión 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)
15 para recubrir las placas. Las placas se bloquearon con 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
20 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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
25 durante 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 H_3PO_4 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
 5 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-
 10 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
 15 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' -
 20 GCCCAGCCGGCCATGGCCSMKGTGCAGCTGGTGGAKTCTGGGGGA-3' (SEQ
 ID NO:18)
 MJ2: 5' -
 GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGA-3' (SEQ
 ID NO:19)
 25 MJ3: 5' -
 GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGCTCAGGTACAGCTGGTGGAGTCT-3' (SEQ
 ID NO:20),

y dos cebadores específicos de CH₂ antisentido:

CH₂: 5' -CGCCATCAAGGTACCAGTTGA-3' (SEQ ID NO:21)
 30 CH₂b₃: 5' -GGGGTACCTGTTCATCCACGGACCAGCTGA-3' (SEQ ID
 NO:22).

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'-CATGTGTAGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC-3' SEQ ID NO:23) y cebador MJ8 (5'-CATGTGTAGATTCTTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGACCTGG-3' SEQ ID NO:24), 5 µl de 10x tampón de reacción, 1 µl de dNTP 10 mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq. El protocolo de PCR 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 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 *SfiI* (New England Biolabs) y volvieron a purificar usando el mismo kit.

5 Se digirieron 80 µg de vector fagemido pMED1 (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b) con *SfiI* durante la noche a 50 °C. Para minimizar la auto-ligación, 20 unidades de las enzimas de restricción *XhoI* y *PstI* se añadieron para cortar el fragmento cortado y la reacción de digestión se incubó
10 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 (*SfiI* durante 5 horas a 50 °C) (relación molar 1:1) durante 3 horas a temperatura ambiente usando el sistema LigaFast Rapid DNA Ligation System (Promega) de acuerdo con
15 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* TGI electrocompetentes (Stratagene) utilizando 5 µl de alícuota de DNA ligado por reacción de
20 transformación, como se ha descrito (Arbabi -Ghahroudi et al, 2009b). El tamaño de la biblioteca se determinó que era 5 x 10⁷ 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
25 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
30 alícuotas.

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

5 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

10 de 2xYT / Amp con 50 $\mu\text{g/ml}$ 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

15 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 MaxisorpTM 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

20 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 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

25 se eluyeron con trietilamina 0,1M , se neutralizaron (50 μl de Tris-HCl 1 M, pH 7,4) y se 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

30 purificado del cultivo de una noche se utilizó como la entrada para la siguiente ronda de 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 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 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 purificación a gran escala usando procedimientos conocidos (véase el Ejemplo 4). Se identificó un clon denominado IGF1 R-5 para un estudio adicional; su secuencia se muestra a continuación.

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDFEVA
TIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGTMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQS
RVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5)

Ejemplo 4: Humanización de IGF1 R-5

Para evitar la posible inmunogenicidad del IGF1 R-5 derivado de llama cuando se aplica como vehículo para la BHE para la terapéutica, a los AcdU derivados de camélido se "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.

Modelación de la estructura 3D de V_HH de camélido. Se identificaron estructuras de molde similares a IGF1 R-5 V_HH mediante búsquedas BLAST contra el banco de datos de proteínas (PDB). La estructura 3D del IGF1 R-5 se

5 aproximó utilizando el modelo de homología basado en 4KRP|B (código PDB| ID de la cadena) como el molde principal, con información adicional de 4FHB | D. A continuación, la estructura de IGF1 R-5 V_HH se construyó mediante la mutación de la estructura principal del molde a la secuencia de IGF1

10 R-5; esto incluía 35 mutaciones en diversas posiciones. A continuación, el modelo de IGF1 R5 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

15 los átomos pesados de la estructura principal de la región 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

20 muestras los ángulos diedros de la región CDR-H3, seguidas de minimización de la energía.

Selección de la estructura principal de la cadena pesada humana para la CDR de camélido. La estructura principal de

25 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

30 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-5 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-5 V_HH también se conservaron además de la secuencia consenso de VH-3 humana. Las secuencias marco de IGF1R-5 V_HH requirieron 18 mutaciones con el fin de llegar a la secuencia consenso humana VH-3 para la humanización marco del 100 %.

10

Identificación de los residuos marco para retromutaciones. El modelo de IGF1R-5 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 5 variantes humanizadas para IGF1 R-5 V_HH (IGF1R-5 H1, H2, H3, H5, H6), en las que las variantes contenían hasta 10 retromutaciones. Algunas de estas 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

30

El IGF1R-5 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
 5 expresión y purificación de proteínas.

Un vector fagemido que contiene el ADN de la construcción de IGF1R-5 se purificó usando el kit MiniPrep Kit (Qiagen). El V_HH IGF1R-5 de unión IGF1R-se amplificó por PCR a partir
 10 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; SEQ ID NO:25)

15 5'-TTGTTCGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTG-3' (inverso;
 SEQ ID NO:26)

El fragmento de PCR y el vector de expresión pSJF2H se digirió con las enzimas de restricción BbsI y BamHI (NEB) de
 20 acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la digestión, cada fragmento IGF1R-5 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*
 25 *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
 30 clonaron en pSJF2H, utilizando métodos similares a los descritos anteriormente, y posteriormente se transformaron en

los clones TG1 de *E. coli* y se seleccionaron como se ha descrito anteriormente.

Expresión de proteínas. Las construcciones de IGF1R-5 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 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 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). Las fracciones de

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

5 Ejemplo 6: Caracterización biofísica de anti-IGF1R V_HH IGF1R-5

Las construcciones de anti-IGF1R V_HH IGF1R-5 expresadas y purificadas en el Ejemplo 5 se caracterizaron mediante 10 cromatografía de exclusión molecular, análisis de la temperatura de fusión y un análisis de resonancia de plasmón superficial. También se realizó el mapeo de epítomos de IGF1R-5 V_HH .

15 *Cromatografía de exclusión por tamaño:* La cromatografía de exclusión molecular empleando Superdex™ 75 (GE Healthcare) se utilizó para eliminar cualquier agregado posible antes del análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR). El tampón de desarrollo usado fue HEPES 10 mM, pH 7,4 que 20 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 los anticuerpos eran monoméricos, según el volumen de elución en 25 comparación con los patrones (Figura 3A).

Temperatura de fusión: La estabilidad térmica de las construcciones de V_HH IGF1R-5 se evaluó usando la medición de la temperatura de fusión (T_f) mediante espectroscopia de CD. 30 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. Las mediciones se realizaron con 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):

$$ff = ([\theta]_T - [\theta]_U) / ([\theta]_F - [\theta]_U)$$

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 (Fig. 2D). 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 de todo V_{HH} humanizado
 5 mejoraron (más altas) en comparación con el IGF1R-5 V_{HH} , lo que sugiere la mejora de las propiedades biofísicas.

Resonancia de plasmón superficial (SPR): La unión de las construcciones de IGF1R-5 V_{HH} monoméricas a IGF1R humano
 10 recombinante inmovilizado (Ejemplo 1) se determinó mediante SPR usando BIACORE 3000 (GE Healthcare). Aproximadamente 3000 unidades de resonancia (UR) de IGF1R humano recombinante (R&D Systems) se inmovilizaron sobre un chip de CM5 Sensor. La inmovilización se llevó a cabo a una concentración de 10 μ g /
 15 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,
 20 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-5 V_{HH} sobre el IGF1R humano inmovilizado y las superficies de referencia a
 25 un caudal de 20 μ l / 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 resultados (véase la figura 3C) muestran que los datos se adaptan bien a un modelo
 30 1:1, dando K_D mostrada en la tabla 2. Esto muestra que IGF1R-5 y las variantes humanizados son ligantes de 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-5 V_{HH} para IGF1R humano (h) como se determina mediante resonancia de plasmón superficial.

	Superficie de h-IGF1R		
	K _D (nM)	k _d (s ⁻¹)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)
IGF1R -5	0,6	3,4 x 10 ⁻⁴	5,3 x 10 ⁵
IGF1R -5 H1	11, 0	4,3 x 10 ⁻³	3,9 x 10 ⁵
IGF1R -5 H2	7,5	2,9 x 10 ⁻³	3,8 x 10 ⁵
IGF1R -5 H3	0,8	4,1 x 10 ⁻⁴	5,2 x 10 ⁵
IGF1R -5 H5	1,6	8,0 x 10 ⁻⁴	5,0 x 10 ⁵
IGF1R -5 H6	1,7	7,2 x 10 ⁻⁴	4,3 x 10 ⁵

Los análisis de SPR se utilizaron más para demostrar que IGF1R-5 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 IGF1R-5 VHH humano a una concentración de 25xK_D

seguido de coinyección de IGF1R-5 tanto a concentraciones $25 \times K_D$, con velocidades de flujo de $20 \mu l / min$ y tiempos de inyección de 5 minutos. Las superficies se regeneraron lavando con tampón de desarrollo. El IGF1R-5 VHH
 5 unido al receptor, con una saturación alcanzado en aproximadamente 38RU en la superficie no regenerado. El ligando de IGF-1 fue capaz de unirse al receptor de IGF1R en presencia del IGF1R-5 VHH con los $\sim 70RU$ (unidades relativas) esperados. La unión simultánea de IGF1R-5 V_{HH} e IGF-1 al
 10 receptor demuestra que ambos se unían a diferentes epítomos. El análisis SPR de IGF1R-5 VHH y receptor de insulina sugirió que IGF1R-5 VHH no puede unirse al receptor de la insulina (datos no mostrados). A pesar de las diferentes unidades relativas (RU) de IGF1R-5 que se unen a un regenerada frente
 15 a una superficie fresca, no regenerada, la afinidad de unión determinada en ambas superficies era muy similares y podría ser reproducido en diferentes experimentos (datos no mostrados).

20 *Mapeo de epítomos:* Los servicios de mapeo de epítomos fueron proporcionados por Pepscan (Lelystad, Países Bajos; pepscan.com). La secuencia de longitud completa de la IGF1R se muestra en la Figura 2. Con base en los resultados del mapeo de epítopo y la representación tridimensional de la
 25 estructura del receptor de la insulina relacionada (según lo publicado en la adhesión de proteínas Banco de Datos no. 2DTG, que no se muestra), el epítopo a la que se sugirió IGF1R-5 se une VHH ser FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO: 11).

Ejemplo 7: Internalización del IGF1R-5 por células
 30 **endoteliales cerebrales**

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

5 IGF1R-5 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
10 (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
15 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 MWCO (Pierce) y se midieron usando un
20 espectrofotómetro Beckman DU530 (Beckman Coulter). El IGF1R-5 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
25 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,
30 respectivamente. Las células se observaron bajo el microscopio de fluorescencia y se capturaron las imágenes.

Si se incubaron a 4 °C, se encontró IGF1R-5 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-5 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). 2005)

Ejemplo 8: Producción de construcciones de IGF1R-5-Fc

Se prepararon, expresaron y aislaron construcciones que comprenden IGF1R-5 V_HH fusionado a un fragmento de anticuerpo murino cristalizable. Tanto una construcción C-terminal (IGF1R-5-MFC) y una construcción de fusión N-terminal IGF1R-5 de ratón Fc (MFC-IGF1R-5) se hicieron, las secuencias de los cuales se muestran en las Figuras 5A-B, con un esquema de las moléculas que se muestran en la Figura 5C. La proteína de fusión (~ 80 kDa) también comprendía un péptido señal en N-terminal (MEFGLSWVFLVAILKGVQC; SEQ ID NO: 40) que no se muestra en la secuencia de las figuras 5A-B, dado que se escinde tras la siguiente secreción.

El ADNc de IGF1R-5 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 pTTO-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

5 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)

10 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

15 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

20 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

25 esterilizó después por filtración mediante el paso a través de una unidad Millex GP (Millipore) de filtro (0,22 µm) y se dividió en alícuotas.

Ejemplo 9: Farmacocinética de IGF1R-5-mFc en LCR y plasma

Se llevó a cabo un ensayo *in vivo* para determinar si IGF1R-5-mFc (Ejemplo 8) es capaz de cruzar al cerebro y, concretamente, al líquido cefalorraquídeo (CSF), así como para cuantificar su presencia en LCR y suero.

5

La técnica utilizada para el muestreo múltiple de cisterna magna CSF fue desarrollado en NRC por modificación de los métodos descritos anteriormente (Huang et al, 1995;. Kornhuber et al, 1986;. Yaksh y Rudy, 1976). 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 cuidados de estos animales.

Ratas Wistar macho 8-10 semanas de edad se anestesiaron (intervalo de peso, 230 a 250 g) con una mezcla de ketamina / xilazina (45/12 mg / kg, ip) y se montaron en un instrumento estereotáxico (cualquier otro dispositivo que mantendrá la cabeza del animal con firmeza podría ser utilizado). Se hace una incisión que comienza en una línea que une las orejas y que se extiende alrededor de 3 cm en dirección caudal se hizo en la línea media: la fascia se retrae del cráneo la exposición de una capa superficial de los músculos del cuello que luego fueron separados por una incisión en la línea media a partir de la cresta occipital y que se extiende caudalmente alrededor de 2 cm. La separación de la musculatura superficial expuesta una capa subyacente de los músculos que

se separó fácilmente a lo largo de la línea media por disección roma. Una herramienta de raspado se utilizó para liberar a los músculos de su punto de origen en el hueso occipital durante aproximadamente 0,5 cm a cada lado de la

5 línea media; la retracción suave de la musculatura del cuello expuesta la membrana atlanto-occipital; a continuación, la cabeza de la rata se hace girar hacia abajo a un ángulo de 45 °. Un pequeño agujero se hizo con la punta de una aguja desechable 27G; cuando la incisión se realiza correctamente,

10 claro peste porcina clásica debe inmediatamente bien a través de la hendidura; tubo de polietileno (PE-20) fue entonces insertado 0,5 cm en la ranura. A continuación, la cánula se fijó a la membrana atlanto-occipital con la ayuda de pegamento o cola Histoacril Vetbond, lo que permite la

15 recogida de muestras durante largos períodos de tiempo (más de una semana) y también la prevención de infecciones u otros contaminantes entren en el LCR; a continuación, la cánula se lavó a fondo con CSF artificial. La parte de recogida de la cánula se une firmemente al hueso occipital con cemento

20 dental. Una vez que la cánula se fija, la parte libre (4-5 cm) se ha enhebrado pensó que la piel con una aguja 20G, el músculo y la piel fueron entonces cerrada, la porción expuesta se corta a la longitud deseada, y la punta fue ligeramente caliente a evitar el reflujo de líquido

25 cefalorraquídeo. Por último, el animal se colocó en una sala de recuperación durante al menos una semana para permitir que el cierre de la cisterna magna. Esta técnica no implica la perforación a través del cráneo, como se describe por otros métodos, evitando el daño de las meninges y el tejido

30 nervioso adyacente.

Una semana después de la canulación cisternal, 5 mg / kg de IGF1R-5mFc o controlar A20.1mFc fusión se inyectó en la vena de la cola. Las ratas se anestesiaron con 3% de isoflurano; Se descartaron los primeros 10 l de la CSF
 5 acumulado en la cánula. 10 l de LCR se recogieron en 0,5, 1, 2, 24 y 48 h) después de la inyección. Se tomaron muestras de sangre (50 µl) de la vena de la cola usando tubos de gel de polímero (Becton, Dickinson and Company de Franklin Lakes, Nueva Jersey EE.UU.) en los mismos puntos de tiempo (Fluttert et al., 2000); Se centrifugaron las muestras (15 min a 1600 RCF; temperatura ambiente). Las muestras se almacenaron a -80 ° C hasta su análisis. Al final de los experimentos se sacrificaron las ratas por decapitación bajo anestesia.

15 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 7.

La extracción de LCR es un procedimiento delicado durante
 20 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 seriamente el valor de una muestra de LCR individual. Por consiguiente,
 25 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 niveles de albúmina en el plasma y en el LCR. Se seleccionó un péptido
 30 APQVSTPTLVEAAR (SEQ ID NO:38) 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 cuantificó en las muestras tanto de LCR como de plasma utilizando SRM como se ha descrito anteriormente. La

5 relación de albúmina se calculó como sigue para cada rata:

$$\text{Relación de albúmina} = \frac{\text{Intensidad por nl de plasma analizado}}{\text{Intensidad por nl de LCR analizado}}$$

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

10

Los resultados se muestran en la Figura 9 y en la Tabla 2. La figura muestra un perfil farmacocinético "típico" en suero de la molécula que contiene Fc. Los niveles en LCR de IGF1R-5Fc aumentan en el tiempo, alcanzando un máximo 24
15 horas después de la inyección, cuando llegan a 2 % de los niveles séricos. Mientras que los niveles séricos / desintegración son similares para las moléculas de fusión A20.1Fc control, sus niveles de LCR son mínimos, alcanzando el 0,04 % de los niveles en suero a las 24 horas. La Tabla 2
20 muestra los parámetros farmacocinéticos de IGF1R5-Fc y el A20.1-Fc control en el LCR y en el suero después de la administración intravenosa sistémica de las dosis equimolares (5 mg / kg de fusiones V_HH--Fc). La semivida en suero de IGF1R5-Fc y el control A20.1-Fc fueron 23 h y 25 h,
25 respectivamente.

El control negativo A20.1Fc (75kD) muestra la relación de suero / LCR a las 24 h similar a las descritas en la literatura para las moléculas de tamaño similar. Una
30 proporción típica de suero / LCR (lumbar) para la albúmina (60 kDa) en estado estacionario es de 0,1 %, mientras que la

relación suero/ LCR para IgG es de 0,07 (Shen et al., 2004, Lin, 2008). La relación de IGF1R5-Fc en suero / LCR a las 24 horas es 50 veces mayor que la de A20.1mFc.

5 La relación de la ACU en LCR/ suero para cada molécula es indicativa de "exposición" del SNC a la construcción durante un periodo de 48 horas. IGF1 R-5-Fx muestra una exposición al SNC 33 veces mayor en comparación con la exposición al SNC de A20.1Fc. Los resultados indican que las ganancias de IGF1 R-5Fc facilitaron el acceso al LCR en comparación con la molécula de fusión V_HH-Fc control; esto podría ocurrir a través de una "secreción" específica por el plexo coroideo, o por medio de "lavado" (difusión a través del sistema ventricular del cerebro o por medio de un flujo mayor de fluido intersticial) a partir de parénquima cerebral después de cruzar la BHE o ambos (Abbott 2004; DeLange, 2002; Groothuis de 2007

También se ha demostrado que construcciones adicionales de ~ 110 kDa y 180kDa son transportadas a través de la BHE por IGF1R-5 o una versión humanizada (datos no mostrados).

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de IGF1R-5Fc and A20.1Fc inyectados de forma sistémica en suero y LCR de la cisterna magna de las ratas.

25

		IGF1R-5Fc	A20.1Fc
CSF	AUC (h*ng/ml)	15750,5	774
Suero	AUC (h*ng/ml)	1369563	2247094

	Semivida (fase de distribución) (h)	22,89	25.46
	Aclaramiento (ml/h)	1,003	0.66
	Relación LCR/suero (24 h) (%)	1.988	0,04
	Relación AUC LCR / suero (%)	1.15003 8	0,034
	Incremento (exposición al LCR)		33,82

Ejemplo 10: Transporte del IGF1 R-5 a través del modelo de la barrera hematoencefálica in vitro

5 Para evaluar si las construcciones V_{HH} IGF1R-5 del 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.

10

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
15 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).

5

Cantidades equimolares (5,6 μ M) de 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-5 V_HH y las construcciones en N-terminal y C-terminal de mFc-IGF1R5 del ejemplo 8 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 5A) y representarse gráficamente. El valor P_{app} se utiliza habitualmente para determinar la capacidad de una molécula para cruzar la BHE. [Qr/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]. 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 IGF1R-5 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-5 V_{HH} (figura 6B) es similar al del control positivo - BHE-permeable para V_{HH} FC5 (documento WO 02/057445). Las variantes humanizadas de IGF1 R-5 mostraron valores de P_{app} más altos similares al IGF1 R-5 silvestre (Figura 6C). Notablemente, IGF1R-5 H2 mostró un aumento significativo del 35 % en valor de P_{app} en comparación con el IGF1R5 silvestre (Figura 6C). Dos variantes humanizadas, IGF1 R-5 H1 y IGF1R H2, que mostraron una mejor penetración en la BHE in vivo (valores P_{app}), también mostraron "constantes de disociación" más rápidas en los estudios de unión al receptor mediante SPR realizada en el presente documento (Figura 3C), lo que sugiere que las constantes de "disociación" más rápidas son deseables para mejorar la transcitosis de anticuerpos que se unen al receptor por transcitosis a través de la BHE mediada por receptor. El IGF1R-5 fusionado a N- o C-terminal de Fc murino (80 kD) tenía valores P_{app} similares al anticuerpo de un solo dominio IGF1R-5 (15 kD), lo que muestra que las moléculas de 80 kD pueden cruzar eficazmente la BHE in vitro cuando se fusionan con IGF1R. En particular, la fusión AL N-terminal de Fc proporciona alguna ventaja (mejora del 15 % en

P_{app}). Estos datos muestran que IGF1R-5 se puede utilizar como una plataforma para diseñar anticuerpos bi-específicos, en particular, para la fusión con el extremo C-terminal de una IgG completa con función terapéutica que requiere el transporte en el cerebro. Estos resultados proporcionan una fuerte indicación de que IGF1 R-5 sufre un transporte transcelular facilitado a través de las células endoteliales del cerebro *in vitro* y podría tener propiedades similares *in vivo*. 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 través de la BHE (datos no mostrados).

Cuantificación absoluta de V_HH utilizando el método de 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 adquisición dependiente 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 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 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.

5 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 μ L) o
10 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
15 disociación fragmentación por disociación inducida por colisión (CID) y la selección de sólo los iones de fragmentos 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
20 formato de datos de espectrometría de masas estándar inmzXML 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
25 para cada uno de sus iones del fragmento que consistían en 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
30 retención esperados. Se definió un V_{HH} como detectable en una 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} 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., 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 3.

5 Tabla 3. 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;
 10 fuertemente; (c) Los límites de detección y cuantificación
 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.

15

Prot	Firmas	SEQ	Ún
eína		ID NO:	ica
IGF1 R-5	EFVATIDWGDGGAR	27	Sí
	TIDNYAMAWSR	28	Sí
	LEESGGGLVQAGGSLR	29	
FC5	ITWGGDNTFYNSVK	30	Sí
FC5- ILIS	ITWGGDNTFYNSVK ^(b)	30	Sí
	TTYADSVK	31	Sí
A20.	EFVAAGSSTGR	32	Sí
1	TFSMDPMAWFR	33	Sí
	DEYAYWQGTQVTVSSGQAGQGSEQK	34	Sí
	DFSDYVMGWFR	35	Sí
EG2	LEESGGGLVQAGDSLRL	36	Sí
	NMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVNSAGTYVSPR	37	Sí

Albúmina	APQVSTPTLVEAAR	38	Sí
-----------------	----------------	----	----

Ejemplo 11: Conjugación del IGF1R-5 a galanina

Para determinar si IGF1R-5 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-5 V_HH o IGF1R-5 fusionado al extremo C o N de Fc murino 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).

15

El IGF1R-5 V_HH y las construcciones de fusión Fc se conjugó con un fragmento de galanina (Gal) de rata con el extremo C-terminal modificado con cisteamida (Biomatic) (GWTLSAGYLLGPHAIDNHRFSFDKHGLT-cisteamida, SEQ ID NO: 39). El esquema para la conjugación se muestra en la Figura 7.

20

Brevemente, 5 mg de IGF1R-5 V_HH (Ejemplo 5) 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 aminas en el V_HH. Posteriormente, el

25

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 µl de EDTA 0,5 M (concentración final 5 mM).

20

Las construcciones de IGF1R-5 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. Las muestras se añadieron 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

30

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

5 centrifugaron durante 2 minutos a 1000xg.

Las muestras conjugadas de IGF1R-5-Gal y IGF1R--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

10 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

Eliminación de endotoxina y determinación de los niveles

15 *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 Amicon-15-50K MWCO por centrifugación a 4000xg durante

20 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 volumen del sobrenadante en la columna se ajustó de nuevo a

25 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 sensibilidad de 10-0,1EU / ml (Charles River Laboratories

30 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.

Las construcciones de fusión Fc se produjeron en células de mamíferos en condiciones estériles. Los niveles de endotoxina se midieron como se ha descrito anteriormente en las muestras purificadas a partir de células y solo las muestras con <0,5 EU por 1 mg se utilizaron para los estudios en animales.

10

Ejemplo 12: Transporte del IGF1 R-5-Gal usando el modelo de Hargreaves

Para evaluar si la IGF1R-5-Gal, mFc-IGF1R-5-Gal, and IGF1R-5-mFc-Gal (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 Cuadros 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.

25

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

30

(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.

Para determinar si IGF1 F1R-5-Gal, mFc-IGF1R-5-Gal, and IGF1R-5-mFc-Gal se liberan a través de la barrera hematoencefálica y pueden unirse a los receptores diana (GALR1 y 2) en el parénquima cerebral, las ratas recibieron una inyección en la vena de cola de IGF1 R-5-galanina (2,93mg / kg o 5,85mg / kg; endotoxina EU = <1 / mg), o mFc-IGF1 R-5-Gal Gal (1,98 mg / kg o 4,96 mg / kg; < 0,5 EU / mg), o IGF1 R-5-MFC-Gal (2,0 mg / kg o 5,0 mg / kg; <0.5EU / mg) o compuestos de control tres días después 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 el éxito de la inducción de analgesia, que solo se puede obtener a través de la liberación éxito de galanina en el parénquima cerebral por IGF1R-5. La galanina solo puede inducir analgesia cuando está presente en el parénquima cerebral y por sí sola no puede cruzar una BHE intacta (Robertson et al., 2011)

25

Los resultados se analizaron como cursos temporales de las latencias de retirada de la pata (PWL, segundos) frente al tiempo (minutos o horas) (Figura 8A-D).

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, IGF1R5-GalmFc-IGF1R-5-Gal, o IGF1R-5-mFc-Gal produjo supresión dependiente de la dosis de la hiperalgesia térmica, lo que sugiere que IGF1R-5 V_{HH} es la entidad responsable de

5 'transportar' la galanina través de la BHE para producir un efecto farmacológico uniéndose a GALR1 y / o 2 en el parénquima cerebral. El efecto de IGF1R-5-Gal es dependiente de la dosis y significativamente más pronunciado que el inducido por FC5-Gal, lo que sugiere que el receptor IGF1R

10 tiene una mayor tasa de transporte a través de la BHE que el receptor FC5 putativo. Estos resultados demuestran que IGF1R-5 V_{HH} puede moléculas grandes 'Ferry' (3kDa - 80 kDa) a través de la BBB utilizando vía de transcitosis mediada por receptores. Se requiere un transporte activo, mediado por el

15 receptor, ya que se sabe que la BHE es impide el paso de todas las moléculas hidrófilas de más de 0,5 kDa.

Ejemplo 13: Inmunodetección de IGF1R-5-mFc

20 Para comprobar que niveles altos de IGF1R-5mFc 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-5-

25 mFc en los cerebros de ratas.

En pocas palabras, los cerebros de los animales del experimento del Ejemplo 11 se cosecharon inmediatamente posteriores a la perfusión de los animales con PBS (es decir,

30 48 horas después de la inyección de 5 mg / kg de la cola de la vena de IGF1R-5-mFc). Los cerebros se congelaron y

seccionaron en criotomo en secciones de 12 μ m. 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. Anti-m-IgG Fc γ -cy3 de cabra (Cat # 115-165-071, Jackson Immuno Reasearch, lote # 106360) 1: 200 en 5% NGS contiene 0,3% de Triton X-100 en 1X PBS, se aplicó durante una noche a Secciones 4C se lavaron tres veces en 1X PBS y se incubaron en conejo-anti-GFAP (Cat # Z0334, 5 Dako) 1: 500 en 5% NGS / 1X PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron ganancia de tres veces en 1 x PBS, y después se incubó en 1: 300 de cabra anti-ratón Alexa 647 (A21235, Invitrogen) o 1: 500 de cabra anti-conejo Alexa 647 (A 21244, Invitrogen) en 1 x PBS. Vasculatura- 15 tinción de lectina RCAI (Cat # FL-1081, Vector) 1: 500 en 1 x PBS Después se añadió durante 10 minutos. Después de lavar tres veces con 1 x PBS, las secciones se cubren con una hoja de cubierta en Dako fluorescente medio de montaje (Cat # S3023, Dako) y se trataron con 2 μ g / ml Hoechst (Cat # H3570, 20 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 4.

25 Tabla 4. Objetivos y canales utilizados para la microscopia de fluorescencia.

	Molécula	Excitac	Emisión
	fluorescente	ión (nm)	(nm)
Vasos RCAI	FITC	495	518

Núcleos	-	Hoechst	350	461
Hoechst33342				
IGF1R-5-m-		Cy3	531	593
Fc				
GFAP		Alexa 647	628	692

Los resultados se muestran en la Figura 10. 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-5FC se acumula en los vasos del cerebro y, también, transmigra la BHE en el parénquima cerebral circundante. Los resultados apoyan la afirmación de que el aumento de los niveles de of IGF1R-Fc 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-5 inducía respuesta farmacológica inducida (analgesia) en los receptores GALR1 y GALR2 del parénquima. Colectivamente, los resultados trans migración 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-5 V_HH trasmigra la BHE intacta a tasas significativamente más altas que otros V_HH a través de trans citosis 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.

Ejemplo 14: Efecto de IGF1R-5 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-5 V_HH o IGF1R-5-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-5 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.

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-5 V_HH o fusión de IGF1R-5-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 11. El análisis de transferencia de tipo Western de la fosforilación de Akt mostró que IGF1R-5 no inhibía la fosforilación de Akt inducida con 10 μg / ml de insulina o por 200 ng /ml de IGF-1 cuando se aplicaron junto con 100 nM de IGF1 R-5 o IGF1R-5-mFc o 500 nM de IGF1R-5-mFc. Tampoco ninguna de V_{H} o las fusiones de Fc indujeron la señalización Akt por sí solos (figura 11A, 11B y 11C, marcados con "-5"). Los resultados demuestran que incluso en presentación bivalente en el formato de fusión de Fc, el IGF1R-5 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-

5 ("aglutinante silencioso") es importante para su aplicación como vehículo para la BHE para la terapéutica, ya que confiere un perfil de seguridad favorable.

5 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,
10 estén abarcadas por las reivindicaciones. Además, la combinación tratada de características podría no ser necesaria para la solución de la invención.

REFERENCIAS

15

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.

20

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

25

Abbott, N. J. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology, Neurochem. Int. 2004, 45, 545-552.

30

Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D (2005) The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic

epitopes in human brain endothelial cells. J
Neurochem. 95(4):1201-14.

Arbabi-Ghahroudi, M. Desmyter A, Wyns L, Hamers R., and
5 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., Ding
10 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.

15

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.

20

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

25 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
30 hypervariable regions affect antigen binding.
Immunotechnology 2 (1996) 169-179

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

De Lange, E. C.; Danhof, M. Considerations in the use of
 5 cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target
 concentrations in the clinical setting: implications of the
 barriers between blood and brain, Clin. Pharmacokinet. 2002,
 41, 691-703.

10 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 delivery vector
 angiopep-2, J. Neurochem. 2008, 106, 1534-1544.

15

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

20 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."
 Nucleic Acids Res 30(2): E9.

25 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.

Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., and Wall, R.
 30 (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 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, R. (2008) *J. Clin. Microbiol.* 46, 328-330.

Flutterm, M., Dalm, S., and Oitzl, M.S. (2000) *Lab Anim* 34, 372-378.

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

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.

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)
- Groothuis D. R.; Vavra M. W.; Schlageter K. E.; Kang E. W.; Itskovich A. C.; Hertzler S.; Allen C. V.; Lipton H. L.
- 10 Efflux of drugs and solutes from brain: the interactive roles of diffusional transcapillary transport, bulk flow and capillary transporters, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007, 27, 43-56.
- 15 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.
- 25 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.
- 30 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., Hirama T., Ding W., MacKenzie R., and Tanha
5 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., Trojahn U., Albaghdadi H., Zhang J., O'Connor
M., Stanimirovic D., Tomanek B., Sutherland G., and Abulrob
15 A. (2010) *Br. J. Pharmacol.* 160, 1016-1028.

Jespers, L., Schon, O., Famm, K., and Winter, G. (2004)
Nat. Biotechnol. 22, 1161-1165.

20 Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences
and segments of sequences in antibodies of different
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.

25

Kim, D.Y., Kandalaft, H., Ding, W., Ryan, S., van Fassen,
H., Hirama, 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.

Lin, J. H. CSF as a surrogate for assessing CNS exposure: an industrial perspective, *Curr. Drug Metab* 2008, 9, 46-59.

15

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

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

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

Nhan T, Burgess A, Cho EE, Stefanovic B, Lilge L, Hynynen K. (2013) Drug delivery to the brain by focused ultrasound
30 induced blood-brain barrier disruption: Quantitative evaluation of enhanced permeability of cerebral vasculature

using two-photon microscopy. J Control Release. 172(1):274-280.

Nicaise M, Valeio-Lepiniec M, Minard P, Desmadril M.
5 (2004) Affinity transfer by CDR grafting on a
nonimmunoglobulin scaffold. Protein Sci. 13(7): 1882-1891.

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

10

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.

15

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.

20

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

Pardridge, W. M. Drug and gene delivery to the brain: the
25 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.

30

- 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.
- 5
- Ridgway, J.B., Presta, L.G., and Carter, P. (1996)
Protein Eng. 9, 617-621.
- Robertson CR, Flynn SP, White HS, Bulaj G (2011)
10 Anticonvulsant neuropeptides as drug leads for neurological
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.
15 26, 115-119.
- Samani, A.A., Chevet, E., Fallavollita, L., Galipeau, J.,
and Brodt, P. (2004) Cancer Research 64, 3380-3385.
- 20 Samuels B.L., J. Clin. Pharmacol. Ther., 54, 421-429
(1993)
- Shen, D. D.; Artru, A. A.; Adkison, K. K. Principles and
applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug
25 delivery and pharmacodynamics, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004,
56, 1825-1857.
- 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.

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. 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. (2003) J. Clin. Microbiol. 41, 667-670.

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

Xiao G, Gan LS.(2013) Receptor-mediated endocytosis and 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.

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.° 519596

Patente europea N.° 626390

Patente de EE.UU. N.° 5693761

15 Patente de EE.UU. N.° 5766886

Patente de EE.UU. N.° 5821123

Patente de EE.UU. N.° 5859205

Patente de EE.UU. N.° 5869619

Patente de EE.UU. N.° 6054297

20 Patente de EE.UU. N.° 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 transmigra 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 GRTIDNYA (SEQ ID NO:1);
- una secuencia de CDR2 de IDWGDGGX (SEQ ID NO: 2); donde X es A o T y
- una secuencia de CDR3 de AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID NO: 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).
3. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 1 o 2, que comprende la secuencia
- X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGKX₆X₇EX₈
- VX₉TIDWGDGGX₁₀RYANSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAV
- YX₁₇CAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTGX₁₈VTVSS (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 V o S; X₆ es D o G; X₇ es L o R; X₈ es F o W; X₉ es A o S; X₁₀ es A o T; X₁₁ es A o S; X₁₂ es G o N; X₁₃ es M o L; X₁₄ es N o R; X₁₅ es E o R; X₁₆ es P o A; X₁₇ es S o Y; y X₁₈ es Q o L,

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:

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFFVATID
WGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGTMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDV
10 ARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVSTID
WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDV
ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:6);

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATID
15 WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDV
ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:7);

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKGLEFFVATID
WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDV
ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:8);

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFFVATID
20 WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKGTMYLQMNSLRAEDTAVYSCAMARQSRVNLDV
ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:9); y

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFFVSTID
WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDV
25 ARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:10),

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
30 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.

5 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 se une a un epítopo que comprende la secuencia FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO:11).

10 8. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está en un formato de presentación multivalente.

15 9. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está unido a un fragmento Fc.

20 10. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 10, en el que el fragmento Fc es el Fc2b ratón o el Fc1 humano.

25 11. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 10, en que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 42, 43, 12, o 13.

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

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

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

15 15. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está inmovilizado sobre una superficie.

16. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el
15 que el anticuerpo o fragmento del mismo está unido a una molécula de carga.

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

18. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 16 o 17, en el que la molécula de
25 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
30 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.

19. 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 12 y 15 a 18 y un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20. Un procedimiento *in vitro* de detección de IGF1R, que 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 12, unido a un agente detectable; y
- b) detectar el agente detectable unido al anticuerpo o fragmento del mismo unido a IGF1R en la muestra de tejido.

21. El método de la reivindicación 20, en el que la muestra es 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.

22. El método de la reivindicación 20 o 21, en el que la etapa de detección (etapa b)) se realiza 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.

5 23. Un método *in vivo* para detectar la expresión de 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 12 unido a un
10 agente detectable; y

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

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

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

20 a) la administración al sujeto de uno o más de un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la reivindicación 12 unido a la molécula de carga,
 en el que el uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo transporta la molécula de interés a través de la BHE.

25

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

30

27. El método de la reivindicación 25 o 26, 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
 5 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
 10 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.

15 28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 26, en el que la administración es por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), o intramuscular (i.m.).

29. Un método de cuantificación de una cantidad de una
 20 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 12, , comprendiendo el método

a) obtener el líquido cefalorraquídeo (LCR) del
 25 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 LCR.

30

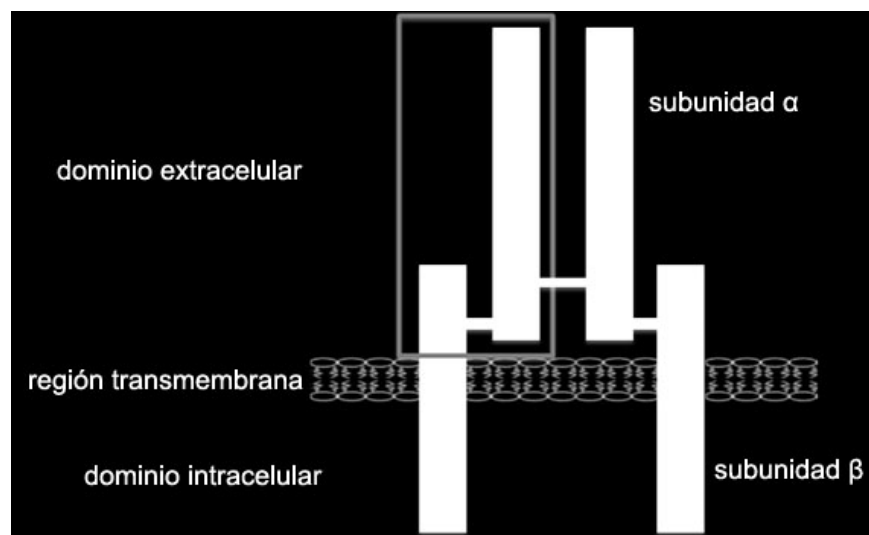


FIG. 1

FIG. 2

MKSGSGGGSP	TSLWGLLFLS	AALSLWPTSG	EICGPGIDIR	NDYQQLKRLE	NCTVIEGYLH	60
ILLISKAEDY	RSYRFPKLTV	ITEYLLLFV	AGLESIGDLF	PNLTVIRGWK	LFYNYALVIF	120
EMTNLKDIGL	YNLRNITRGA	IRIEKNADLC	YLSTVDWSLI	LDAVSNNYIV	GNKPPKECGD	180
LCPGTMECKP	MCEKTTINNE	YNRCWTTNR	CQKMPSTCG	KRACTENNEC	CHPECLGSCS	240
APDNDDTACVA	CRHYYYAGVC	VPACPPNTYR	FEGWRCVDRD	FCANILSAES	SDSEGFVIHD	300
GECEMCECPG	FIRNGSQSMY	CIPCEGPCPK	VCEEEKTKTK	IDSVTSQML	QGCTIFKGNL	360
LINIRRGNNI	ASELENFMGL	IEVVTGYVKI	RHSHALVSL	FLKNLRLILG	EEQLEGNYSF	420
YVLNDQNQQ	LWDWDHRNLT	IKAGKMYFAF	NPCLCVSEIY	RMEEVTGKKG	RQSKGDINTR	480
NNGERASCES	DVLHFTSTTT	SKNRITITWH	RYRPPDYRDL	ISFTVYVYKEA	PFKNVTEYDG	540
QDACGSNSWN	MVDVDLPPNK	DVEPGILLHG	LKPWTQYAVY	VKAVTLTME	NDHIRGAKSE	600
ILYIIRTNASV	PSIPLDVLSA	SNSSSQLIVK	WNPPSLPNGN	LSYIIVRWQR	QPQDGYLYRH	660
NYCSKDKIPI	RKYADGTIDI	EEVTENPKTE	VCGGEGKPGC	ACPKEAEKQ	AEKEEAERYK	720
VFENFLHNSI	FVPRPErrrr	DVMQVANTTM	SSRSRNTTAA	DTYNITDPPE	LETEYPFFES	780
RVDNKERTVI	SNLRPFTLYR	IDIHSCNHEA	EKLGCASNF	VFARTMPAEG	ADDIPGPVTW	840
EPRPENSIFL	KWPEPENPNG	LILMYEIKYG	SQVEDQRECV	SRQEYRKYGG	AKLNRLNPGN	900
YTARIQATSL	SGNGSWTDPV	FFYVQAKTGY	ENFIHLIAL	PVAVLLIVGG	LVIMLYVFHR	960
KRNNNSRLGNG	VLYASVNPEY	FSAADVYPD	EWVAREKIT	MSRELGGQSF	GMVYEGVAKG	1020
VVKDEPETRV	AIKTVNEAAS	MRERIEFLNE	ASVMKEFNCH	HVVRLLGVS	QGQPTLVIME	1080
LMTRGDLKSY	LRLRPPEMEN	NPVLAPPSLS	KMIQMAGETA	DGMAYLNANK	FVHRDLAARN	1140
CMVAEDFTVK	IGDFGMDTRDI	YETDYRKGK	KGLLPVRWMS	PESLKDGVFT	TYSDVWSFGV	1200
VLWEIATLAE	QPYQGLSNEQ	VLRFVMEGGL	LDKPDNCPDM	LFELMRMCWQ	YNPKMRPSFL	1260
EIISSIKEEM	EPGFREVSYF	YSEENKLEP	EELDLEPENM	ESVPLDPSAS	SSSLPLPDRH	1320
SGHKAENGPG	PGVLVLRASF	DERQPYAHMN	GGRKNERALP	LPQSSTC		1367

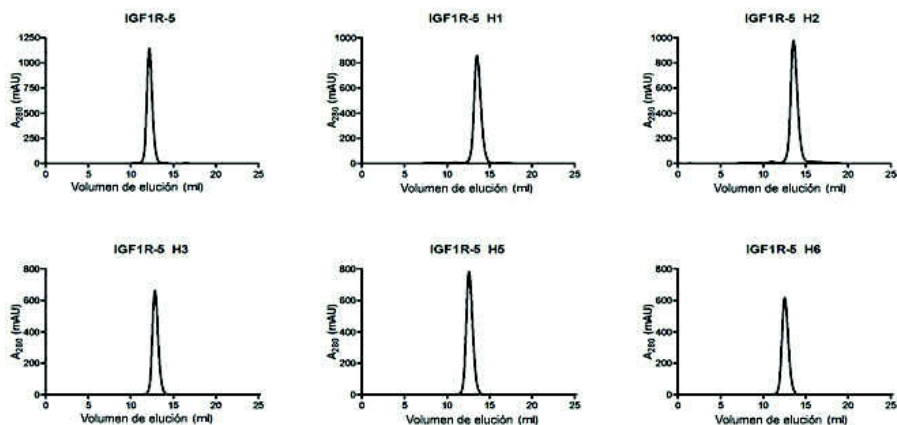


FIG. 3A

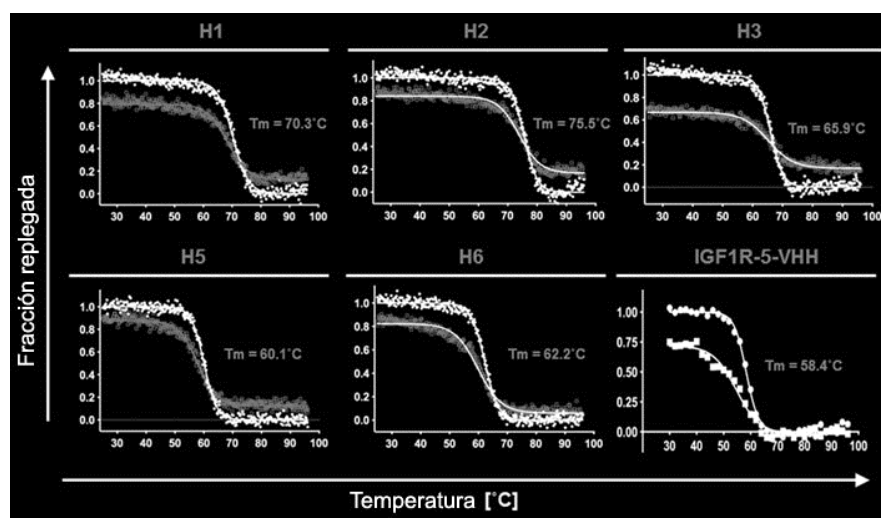
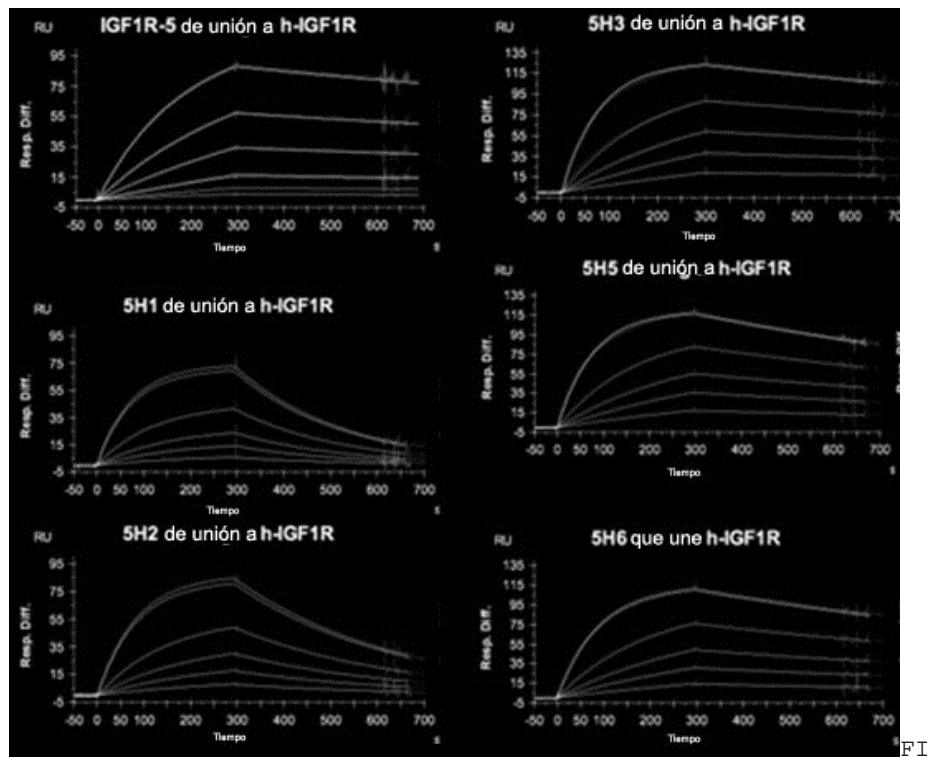


FIG. 3B



G. 3C

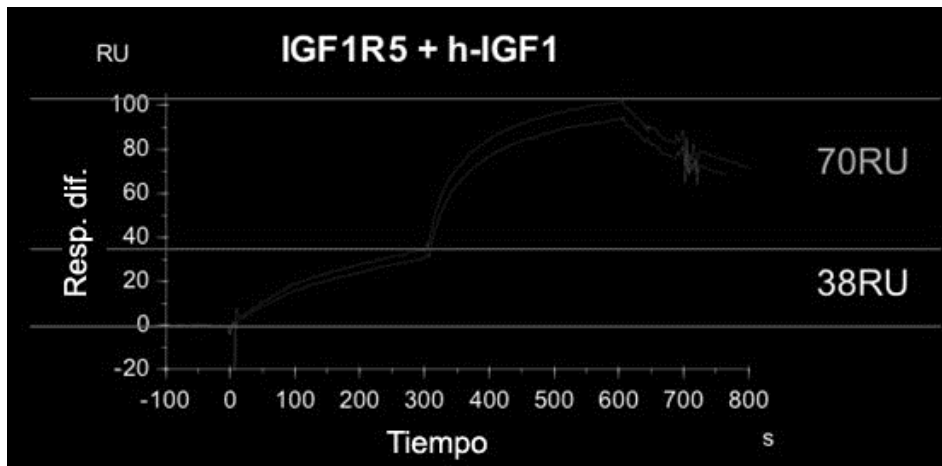


FIG. 3D

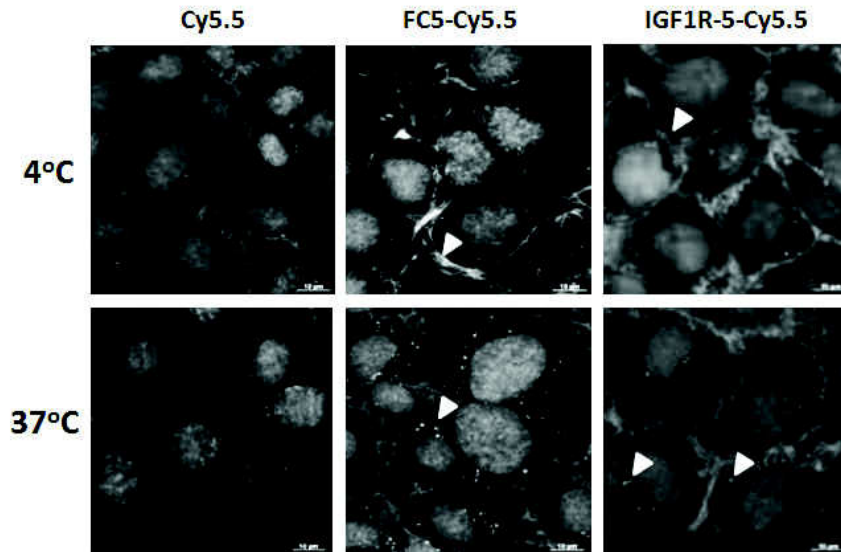


FIG. 4

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANS
 VKGRFTISRDNAGTMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTSS
 MTVDDKKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMSLTPKVTCTVVVDVSE
 DDPDVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPS
 IERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLD
 SDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTD SFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

FIG. 5A

EPSPGISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMSLTPKVTCTVVVDVSEDDPDVQI
 SWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKI
 KGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSY
 FIYSKLNMKTSKWEKTD SFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGGGGSGGGGSQVKLEESGGGLVQ
 AGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNAG
 TMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTSS

FIG. 5B

5

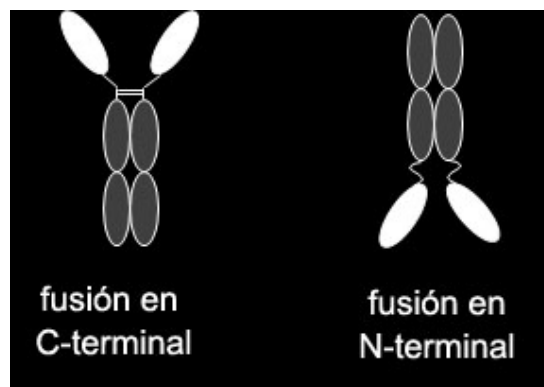


FIG. 5C



FIG. 6A

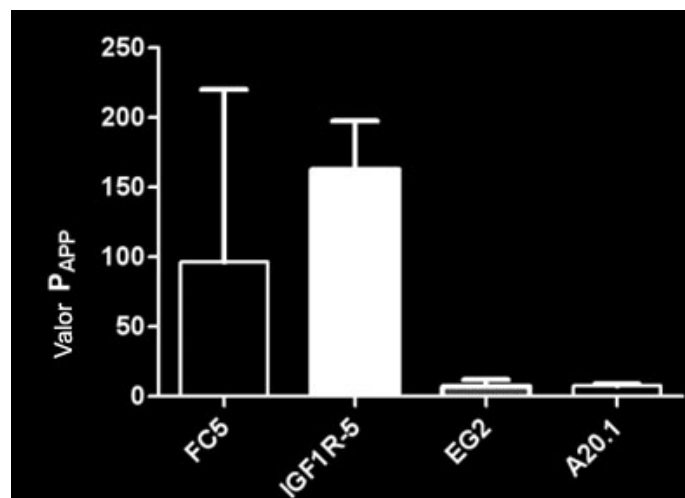


FIG. 6B

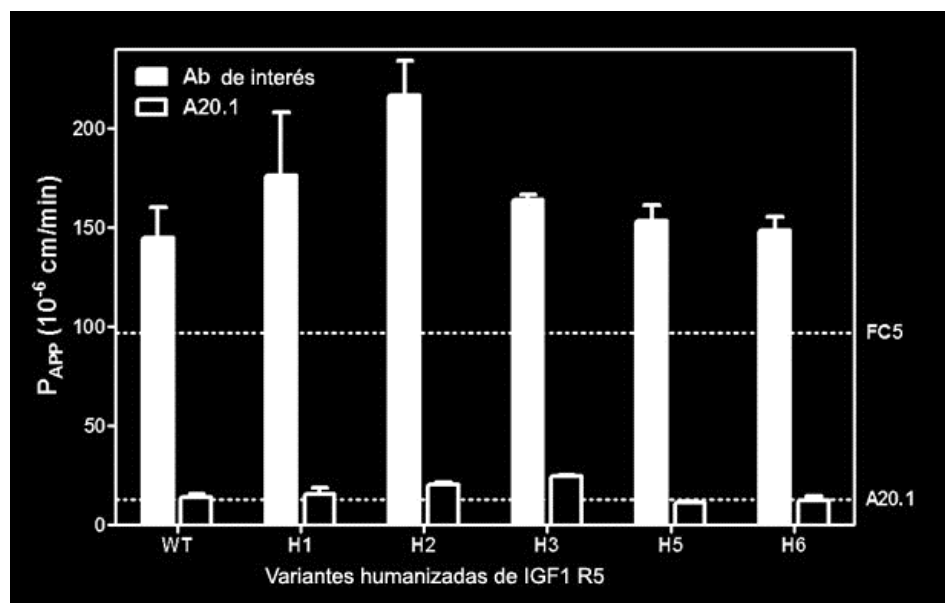


FIG. 6C

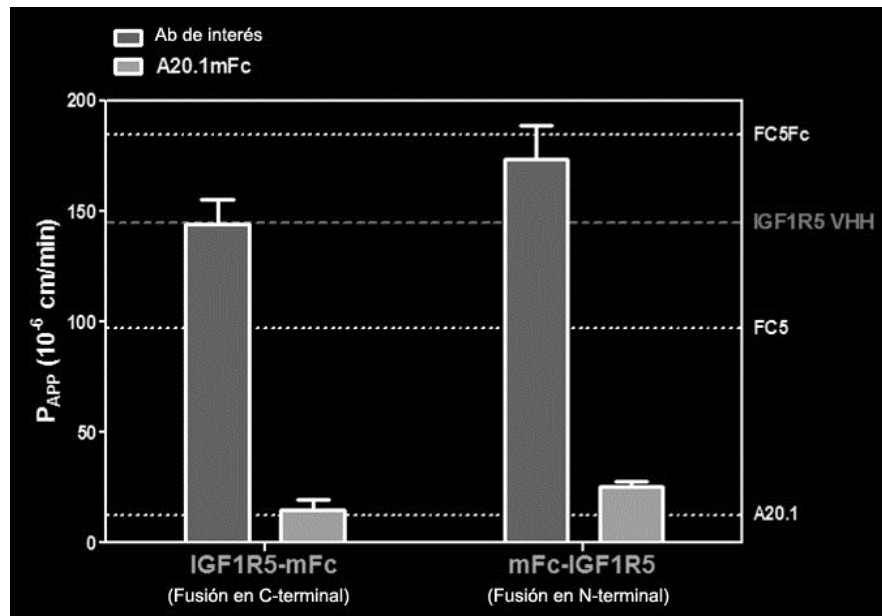
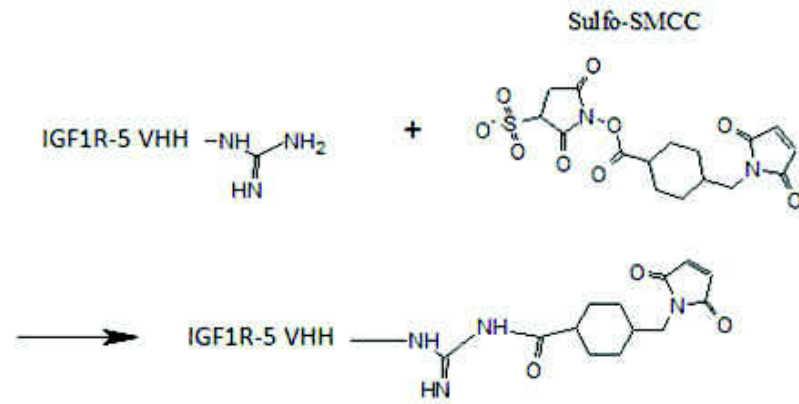


FIG. 6D

1)



2)

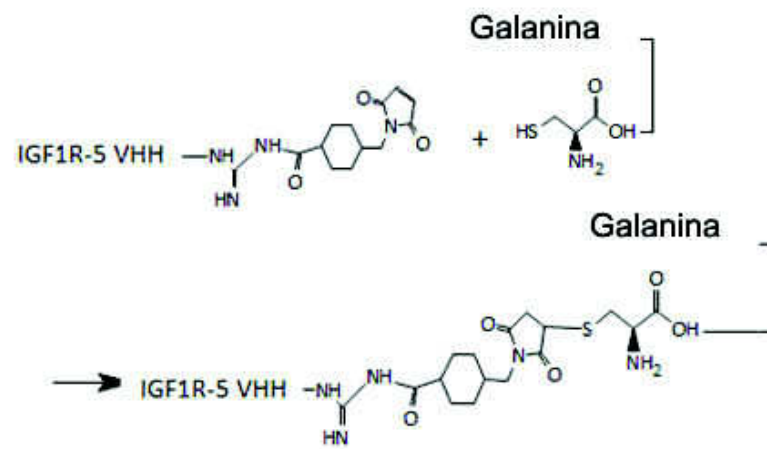


FIG. 7

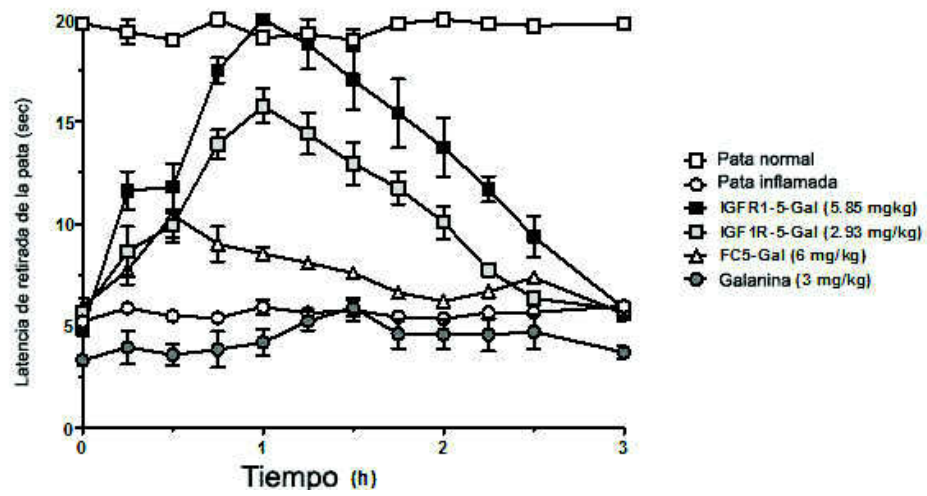


FIG. 8A

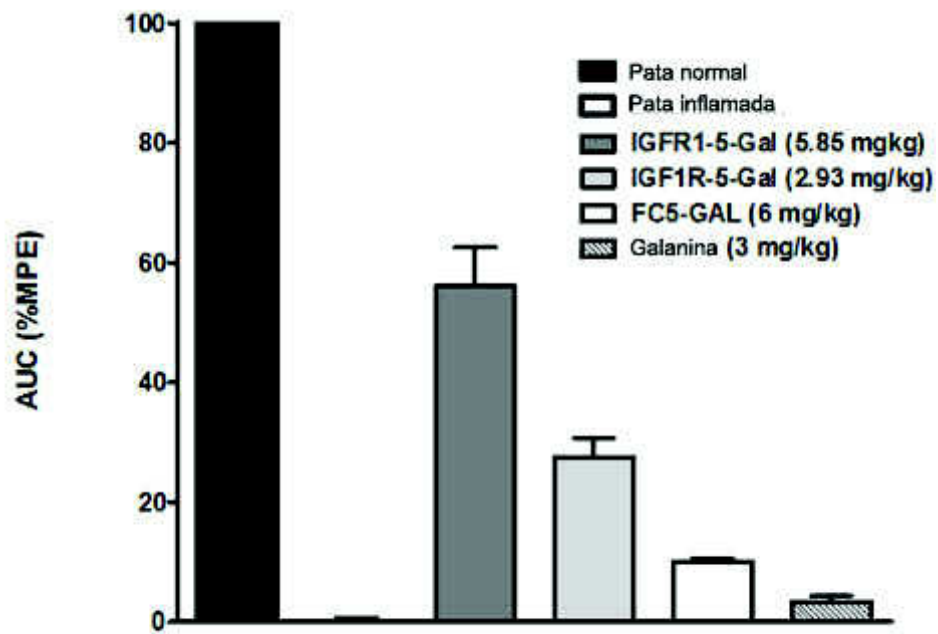


FIG. 8B

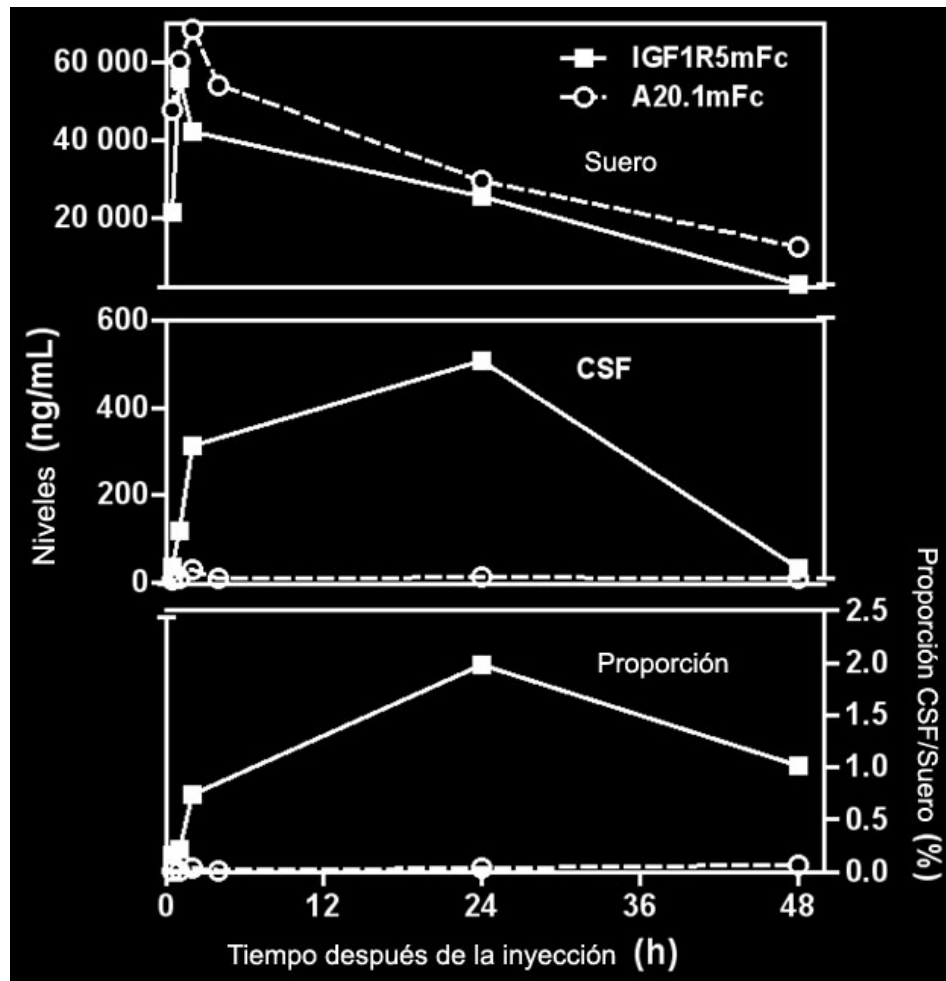


FIG. 9

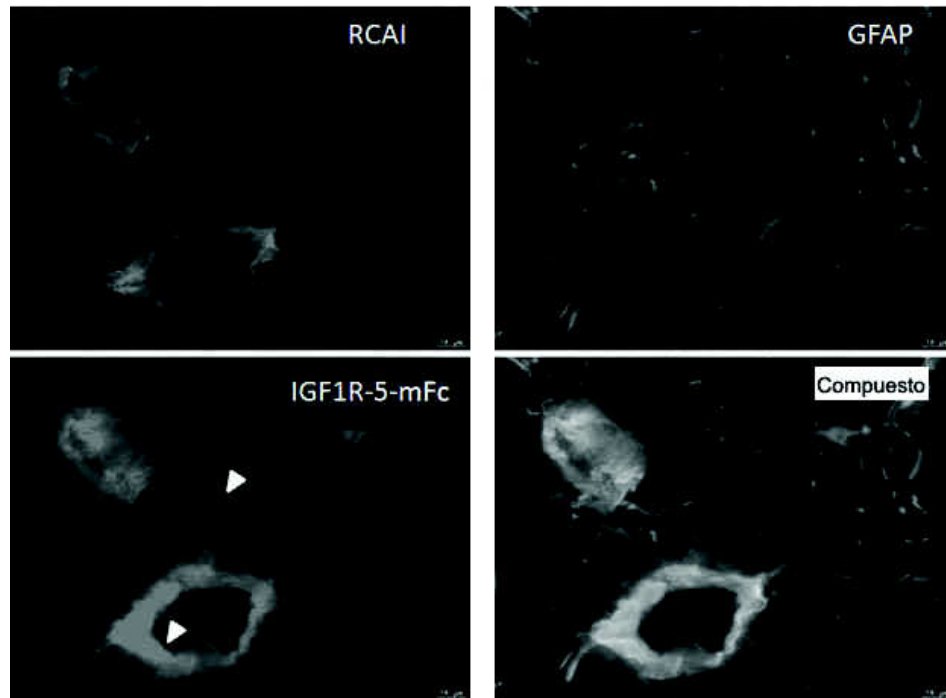


FIG. 10

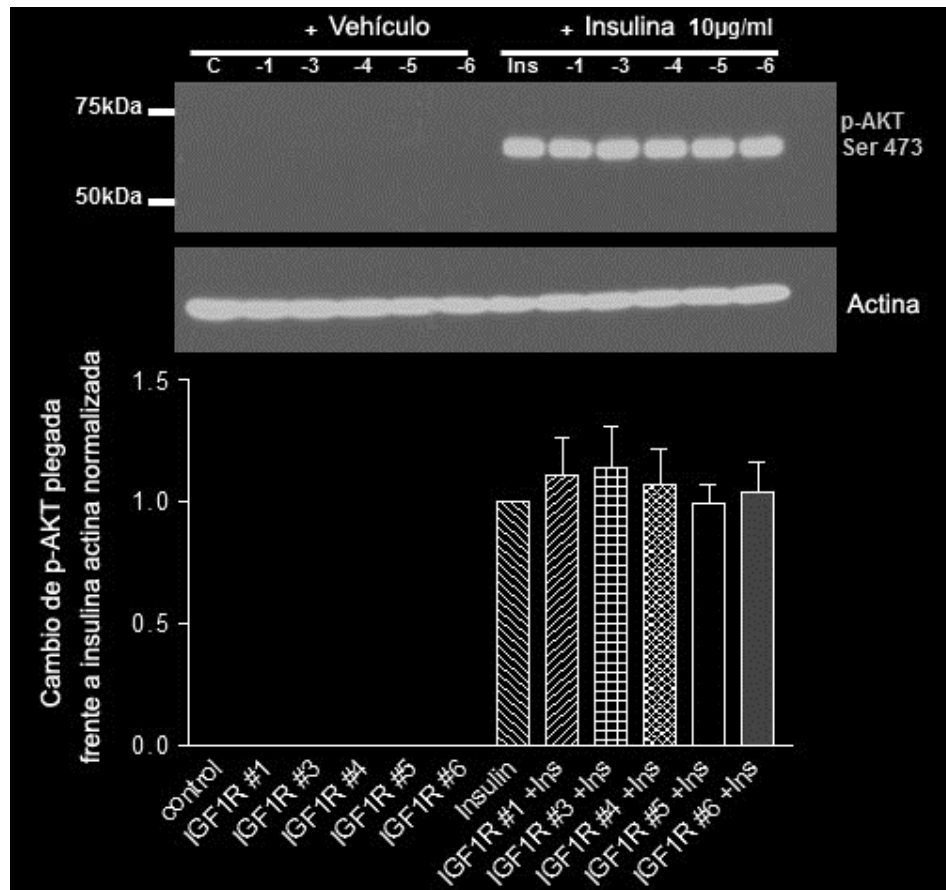


FIG. 11A

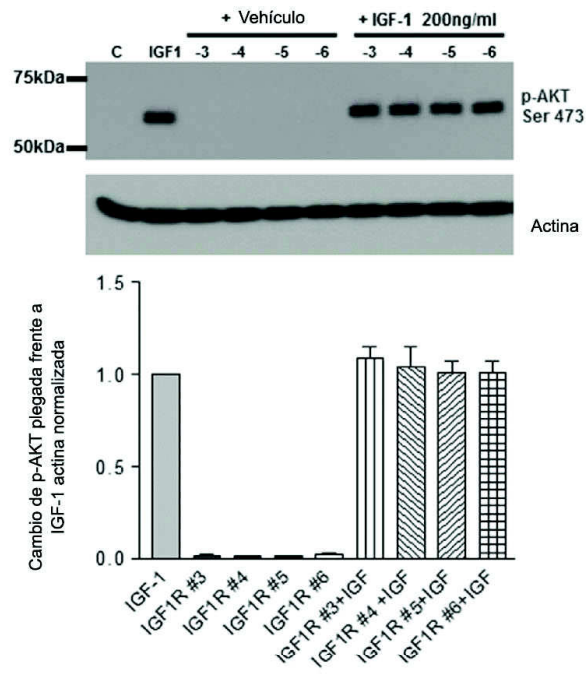


FIG. 11B

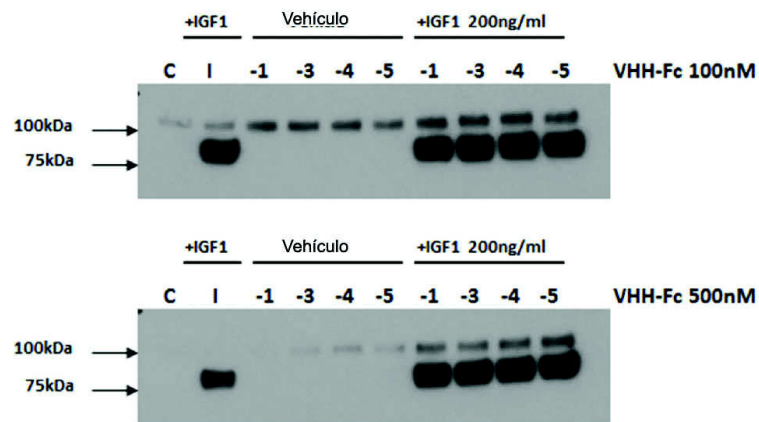


FIG. 11C

RESUMEN

La presente invención se refiere a anticuerpos aislados o purificados o fragmentos de los mismos específicos para el
5 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
10 terapia, así como métodos terapéuticos.