# ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE TRANSFERRINA CON AFINIDAD DISEÑADA

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-receptor de transferrina con tasas de disociación diseñadas para el receptor de transferrina humano y a su uso como módulo de lanzadera para la barrera hematoencefálica.

## ANTECEDENTES

La penetración en el cerebro de los fármacos para trastornos neurológicos tales como, por ejemplo, grandes fármacos bioterapéuticos o fármacos de molécula pequeña que tienen baja penetración en el cerebro está estrictamente limitada por la grande e impermeable barrera hematoencefálica (BHE) junto con los otros componentes celulares en la unidad neurovascular (UNV). Se han ensayado muchas estrategias para superar este obstáculo y una es utilizar rutas de transcitosis mediadas por receptores endógenos expresados en el endotelio capilar del cerebro (receptor de la barrera hematoencefálica). Las proteínas recombinantes, tales como anticuerpos o péptidos recombinantes se han diseñado contra estos receptores para permitir el suministro mediado por receptores de agentes bioterapéuticos al cerebro. Sin embargo, siguen sin explorarse las estrategias para maximizar la captación en el cerebro a la vez que se minimiza la mala clasificación en las células endoteliales cerebrales (BEC) y el alcance de la acumulación en determinados orgánulos (especialmente orgánulos que dan lugar a la degradación del agente bioterapéutico) las BEC.

Los anticuerpos monoclonales y otros agentes bioterapéuticos tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de patologías en el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, su ruta hacia el cerebro se ve bloqueada por la BHE. Estudios anteriores han demostrado que un muy pequeño porcentaje (aproximadamente el 0,1 %) de una IgG inyectada el torrente sanguíneo es capaz de penetrar en el compartimento del SNC (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52 (1974) 1158-1164). De hecho, esto limitará cualquier efecto farmacológico debido a la baja concentración del anticuerpo en el SNC.

Se ha observado previamente que el porcentaje del anticuerpo que se distribuye en el SNC podría mejorarse aprovechando los receptores de la BHE (es decir, receptor

de la transferrina, receptor de insulina y similares) (véase, por ejemplo, el documento WO 95/02421).

Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas de administración de fármacos para trastornos neurológicos a través de la BHE para portar los fármacos al cerebro de manera eficaz.

En el documento WO 2014/033074 se comunica una lanzadera para la barrera hematoencefálica.

En el documento WO 2014/189973 se comunican anticuerpos anti-receptor de transferrina y métodos de uso. Se comunica además que usar como diana un receptor de la BHE con un anticuerpo tradicional específico de alta afinidad generalmente da como resultado un aumento limitado en el transporte de la BHE. Se ha observado además que la magnitud de la captación del anticuerpo y su distribución en el SNC es inversamente proporcional a su afinidad de unión por el receptor de la BHE entre los anticuerpos anti-BHE estudiados. Por ejemplo, un anticuerpo de baja afinidad para el receptor de transferrina (TfR) dosificado a niveles de dosis terapéutica mejora en gran medida el transporte por la BHE y la retención en el SNC del anticuerpo anti-TfR en relación con un anticuerpo anti-TfR de mayor afinidad, y hace posible obtener más fácilmente concentraciones terapéuticas en el SNC (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43). La prueba de dicho transporte por la BHE se logró usando un anticuerpo biespecífico que se une tanto a TfR como a la enzima escisora de la proteína amiloide precursora (APP), β-secretasa (BACE1). Una sola dosis sistémica del anticuerpo biespecífico anti-TfR/BACE1 diseñado usando un anticuerpo de baja afinidad no solo dio como resultado una captación significativa del anticuerpo en el cerebro, sino que también redujo drásticamente los niveles de Aβ1-40 cerebral en comparación con el solo el anticuerpo monoespecífico anti-BACE1, lo que sugiere que la penetración en la BHE afecta a la potencia del anticuerpo anti-BACE1 (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43; Yu et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra44).

Además, se hace necesaria una evaluación no clínica exhaustiva de los anticuerpos monoclonales (mAb) previstos para su aplicación terapéutica debido a la creciente complejidad de los aspectos del diseño de anticuerpos y la variabilidad inducida por la diversidad de sistemas celulares de producción recombinante para la generación de anticuerpos. Además, la compleja estructura, las funciones biológicas únicas y las mayores semividas de los mAb en comparación con los fármacos de molécula pequeña tradicionales se suman a las consideraciones de seguridad además de las

preocupaciones debidas al uso clínico prolongado de los mAb para el tratamiento de enfermedades crónicas (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., et al., Mol. Cells 20 (2005) 17-29).

El objetivo general de los estudios no clínicos para mAb es definir las propiedades toxicológicas del mAb en cuestión y proporcionar información para el desarrollo del producto. Los objetivos principales de la evaluación no clínica son (1) identificación de órganos diana respecto de su toxicidad y determinar si la toxicidad es reversible después del tratamiento, (2) identificación de una dosis inicial segura para ensayos clínicos de fase I y posteriores esquemas de escalado de dosis, (3) proporcionar información para controlar parámetros de seguridad en los ensayos clínicos y (4) proporcionar datos de seguridad para apoyar afirmaciones en el prospecto del producto. Para lograr estos objetivos, se llevan a cabo estudios no clínicos tanto *in vitro* como *in vivo* dirigidos a definir y entender las propiedades farmacológicas de lanticuerpo (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., En: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals“; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

Para la evaluación no clínica satisfactoria de un mAb, deben seleccionarse para ensayo las especies animales más relevantes (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Una especie relevante es una en la que el anticuerpo es farmacológicamente activo, el antígeno diana debe estar presente o expresarse y el perfil de reactividad cruzada de tejidos debe ser similar a seres humanos (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126; Subramanyam, M. y Mertsching, E., En: Cavagnaro J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., et al., En: Cavagnaro, J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Usando ensayos inmunoquímicos o funcionales, puede identificarse una especie animal relevante que expresa el epítopo deseado y que demuestra un perfil de reactividad cruzada de tejidos similar a los tejidos humanos (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., En: Cavagnaro, J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Los estudios de reactividad cruzada de especie, que son útiles en este proceso, implican un estudio inmunohistoquímico de tejidos de una diversidad de especies usando micromatrices de tejido multi-especie comercialmente disponibles (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., En: Cavagnaro, J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals".

Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Como alternativa, la evaluación de la unión de anticuerpos a células de estos animales mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) es típicamente más sensible que el análisis inmunohistoquímico de secciones de tejido (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. y Mertsching, E., En: Cavagnaro J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205). Deben compararse las secuencias de ADN y aminoácidos del antígeno diana entre especies; debe determinarse la homología entre especies (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. y Mertsching, E., En: Cavagnaro J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Además, deben ser comparables la biodistribución, función y estructura del antígeno entre las especies animales relevantes y los seres humanos para permitir la evaluación de la toxicidad que surge de la unión antígeno diana, que se cita como toxicidad en la diana (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20). Además, las fuertes similitudes en la distribución tisular del antígeno diana en las especies animales y seres humanos hacen más posible que la toxicidad identificada en los órganos diana prediga toxicidades potenciales en seres humanos. La falta de similitud en la distribución tisular de antígeno entre las especies animales y seres humanos no impide completamente el uso de especies animales para estudios de toxicidad, pero estas diferencias tienen que tomarse en consideración para la evaluación de riesgo en seres humanos. En cuanto a la densidad o afinidad del antígeno, tampoco es necesaria una equivalencia absoluta entre el modelo animal y los seres humanos. Debe incluirse una justificación en cuanto a la relevancia de las especies seleccionadas para las pruebas de toxicidad en la presentación a las agencias reguladoras. Si solo se usa una especie para la evaluación se seguridad, es obligatorio un resumen de los experimentos que demuestran la ausencia de especies relevantes adicionales (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11).

Si el anticuerpo monoclonal previsto para un uso terapéutico no tiene reactividad cruzada entre especies, debería usarse un anticuerpo subrogado o una especie diferente para el modelo. Por tanto, los anticuerpos subrogados son una solución potencial para las limitadas pruebas de seguridad posibles con anticuerpos monoclonales humanizados con reactividad cruzada entre especies restringida. Sin embargo, actualmente no hay criterios definidos mediante los cuales debería juzgarse un anticuerpo subrogado antes de su uso para determinar cuestiones de seguridad para el agente clínico (Regulatory Toxicology and Pharmacology, volumen

40, 3ª edición, Diciembre de 2004, Páginas 219-226).

Por tanto, para identificar un modelo animal para un mAb particular, tienen que tenerse en cuenta las consideraciones anteriores. Sin embargo, es necesario que el mAb en cuestión tenga reactividad cruzada con el antígeno diana de la especie de ensayo. De lo contrario, no podría usarse incluso la especie de ensayo más adecuada. Por lo tanto, existe la necesidad de mAb que no tengan reactividad cruzada intra-especie pero que tengan reactividad cruzada entre especies por su diana en seres humanos y la especie prevista para los ensayos no clínicos.

En el documento EP 2 708 560 se comunica un anticuerpo que reconoce específicamente el receptor de transferrina. En el documento FR 2 953 841 se comunican anticuerpos dirigidos contra el receptor de transferrina y usos de los mismos para la inmunoterapia de tumores dependientes de hierro. En el documento US 2009/162359 se comunican anticuerpos biespecíficos bivalentes.

**SUMARIO**

Se ha descubierto que los anticuerpos anti-receptor de transferrina, tal como se comunican en el presente documento, pueden usarse como módulo de lanzadera para la barrera hematoencefálica para suministrar una entidad efectora cerebral al cerebro a través de la barrera hematoencefálica. En determinadas realizaciones, el módulo de lanzadera de barrea hematoencefálica es una entidad de unión monovalente que se une específicamente al receptor de transferrina. Los anticuerpos anti-receptor de transferrina tal como se comunican en el presente documento cuando se usan como módulo de lanzadera de barrera hematoencefálica son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer con co-morbilidad de enfermedad de Parkinson.

En el presente documento se comunican anticuerpos anti-receptor de transferrina que se unen específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco (cyTfR). En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-receptor de transferrina

- se une al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco (cyTfR);
- tiene una velocidad de disociación por el receptor de transferrina humano que es igual a o menor a (es decir, como máximo) a la del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 por el receptor de

transferrina de macaco, en donde las velocidades de disociación se determinan mediante resonancia de plasmón superficial, y en donde el anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 tiene un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 64 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 65;

- se une con una velocidad de disociación por el receptor de transferrina humana que es de entre, incluyendo, 0,1 1/s y 0,005 1/s.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humana y al receptor de transferrina de macaco, que comprende

i) un dominio variable de cadena pesada humanizado derivado del dominio variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 01, y

ii) un dominio variable de cadena ligera humanizado derivado del dominio variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 26,

en donde el anticuerpo tiene una velocidad de disociación por el receptor de transferrina humano que es igual o menor que (es decir, como máximo) a la velocidad de disociación del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 por el receptor de transferrina de macaco,

en donde las velocidades de disociación se determinan mediante resonancia de plasmón superficial, y

en donde el anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 tiene un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 64 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 65.

En una realización, la velocidad de disociación por el receptor de transferrina humano es de entre, e incluyendo, 0,1 1/s y 0,005 1/s.

En una realización, el anticuerpo tiene en el dominio variable de cadena ligera en la posición 80 un resto de aminoácido de prolina (P) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene en el dominio variable de cadena ligera en la posición 91 un resto de aminoácido de asparagina (N) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene en el dominio variable de cadena ligera en la posición 93 un resto de aminoácido de alanina (A) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene en el dominio variable de cadena pesada en la posición 100g un resto de aminoácido de serina (S) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene en el dominio variable de cadena pesada en la posición 100g un resto de aminoácido de glutamina (Q) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene en el dominio variable de cadena pesada en la posición 65 un resto de aminoácido de serina (S) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene en el dominio variable de cadena pesada en la posición 105 un resto de aminoácido de glutamina (Q) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene en el dominio variable de cadena ligera en la posición 80 un resto de aminoácido de prolina (P), en el dominio variable de cadena ligera en la posición 91 un resto de aminoácido de asparagina (N), en el dominio variable de cadena ligera en la posición 93 un resto de aminoácido de alanina (A), en el dominio variable de cadena pesada en la posición 100g un resto de aminoácido de serina (S), en el dominio variable de cadena pesada en la posición 65 un resto de aminoácido de serina (S), y en el dominio variable de cadena pesada en la posición 105 un resto de aminoácido de glutamina (Q) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene en el dominio variable de cadena ligera en la posición 80 un resto de aminoácido de prolina (P), en el dominio variable de cadena ligera en la posición 91 un resto de aminoácido de asparagina (N), en el dominio variable de cadena ligera en la posición 93 un resto de aminoácido de alanina (A), en el dominio variable de cadena pesada en la posición 100g un resto de aminoácido de glutamina (Q), en el dominio variable de cadena pesada en la posición 65 un resto de aminoácido de serina (S), y en el dominio variable de cadena pesada en la posición 105 un resto de aminoácido de glutamina (Q) (numeración de acuerdo con Kabat).

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, 72 o 73; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

En una realización preferida, el anticuerpo anti-receptor de transferrina comprende (a) una HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) que comprende

i) una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, y

ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37,

en donde el anticuerpo tiene aproximadamente la misma velocidad de disociación que un anticuerpo que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 24 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 37.

En una realización, la velocidad de disociación por el receptor de transferrina humano es de entre, e incluyendo, 0,1 1/s y 0,005 1/s.

Un aspecto preferido tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) que comprende

i) una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, y

ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

En una realización de todos los aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico que tiene al menos una especificidad de unión por el receptor de transferrina y al menos una especificidad de unión por una diana terapéutica. En una realización, el anticuerpo comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al receptor de transferrina y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral. En una realización adicional, el antígeno cerebral se selecciona entre el grupo que consiste en Abeta humano, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), alfa-sinucleína humana, tau humana, que está fosforilada en un resto de tirosina o serina, CD20 humano, proteína precursora de amiloide (APP), y glucocerebrosidasa humana. En una realización preferida, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a

i) el receptor de transferrina como a Abeta, o
ii) el receptor de transferrina como a CD20, o
iii) el receptor de transferrina como a alfa-sinucleína, o
iv) el receptor de transferrina como a fosfo-tau, o
v) el receptor de transferrina como a HER2, o
vi) el receptor de transferrina como a glucocerebrosidasa.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 81 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 82 de sitio de unión para Abeta humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 79 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 80 de sitio de unión para CD20 humano. En una realización, la región variable de cadena pesada comprende un reemplazo del resto de aminoácido en la posición 11 de Kabat por cualquier aminoácido excepto leucina. En una realización, la

sustitución comprende el reemplazo del resto de aminoácido en la posición 11 de Kabat por un aminoácido no polar. En una realización preferida, la sustitución comprende un reemplazo del resto de aminoácido en la posición 11 de Kabat en el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 79 por un resto de aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, y fenilalanina.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 84 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 85 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 86 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 87 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 88 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 89 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 90 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 91 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 92 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 93 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 94 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y un sitio de unión para i) glucocerebrosidasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, o ii) una variante funcional de la SEQ ID NO: 97 que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, o iii) una variante funcional de la SEQ ID NO: 97 que tiene una o más mutaciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos, o iv) una variante funcional truncada de la SEQ ID NO: 97 que tiene al menos un resto de aminoácido eliminado en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal o dentro de la secuencia, o v) una combinación de iii) e iv).

En una realización de todos los aspectos, el anticuerpo comprende

- i) una región Fc homodimérica de la subclase IgG1 humana, opcionalmente con las mutaciones P329G, L234A y L235A, o
- ii) una región Fc homodimérica de la subclase IgG4 humana, opcionalmente con las mutaciones P329G, S228P y L235E, o
- iii) una región Fc heterodimérica en la que
  - a) un polipéptido de región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A y Y407V, o
  - b) un polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C, y el otro polipéptido de región Fc comprende las mutaciones

T366S, L368A, Y407V, y S354C, o

c) un polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366W e S354C, y el otro polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y Y349C,

o

iv) una región Fc heterodimérica de subclase IgG4 humana en la que ambos polipéptidos de región Fc comprenden las mutaciones P329G, L234A y L235A y

a) un polipéptido de región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A y Y407V, o

b) un polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C, y el otro polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V, y S354C, o

c) un polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366W e S354C, y el otro polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y Y349C,

o

v) una región Fc heterodimérica de subclase IgG4 humana en la que ambos polipéptidos de región Fc comprenden las mutaciones P329G, S228P y L235E y

a) un polipéptido de región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A y Y407V, o

b) un polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C, y el otro polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V, y S354C, o

c) un polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366W e S354C, y el otro polipéptido de región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C.

En una realización de todos los aspectos, en anticuerpo es un CrossMab.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende

i) un dominio variable de cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57 y 58, y un dominio variable de cadena ligera seleccionado entre el grupo que consiste en las

SEQ ID NO: 60, 61, 62 y 63,

o

ii) un dominio variable de cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25, y un dominio variable de cadena ligera seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 y 47.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo tal como se comunica en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo tal como se ha comunicado en el presente documento para su uso como medicamento.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es el uso de un anticuerpo tal como se ha comunicado en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico.

En una realización, el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno o enfermedad ocular, un trastorno comicial, un trastorno del almacenamiento lisosomal, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno de la conducta, inflamación del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, cáncer positivo a CD20 con metástasis cerebral, y un cáncer positivo a Her2 con metástasis cerebral.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es el uso de un anticuerpo tal como se ha comunicado en el presente documento para la fabricación de un medicamento para transportar uno o más compuestos a través de la barrera hematoencefálica (BHE).

**DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1:** Esquema de un ensayo transcitosis.

**Figura 2:** Velocidades de disociación de diferentes anticuerpos anti-receptor de transferrina determinadas a 25 ℃ usando BIAcore; 1 : 128,1; 2: 128.1 fusionado al anticuerpo anti-pTau mAb86; 3: 567; 4: 932; 5: 567 fusionado al anticuerpo anti-pTau mAb86; 6: 1026; 7: 1027; cuadrados: unión a receptor de transferrina de macaco; círculos: unión a receptor

de transferrina de ser humano; eje y: velocidad de disociación [1/s].

**Figura 3:** Velocidades de disociación de diferentes anticuerpos anti-receptor de transferrina determinadas a 37 ℃ usando BIAcore; 1 : 128,1; 2: 932; 3: 1026; 4: 1027; cuadrados: unión a receptor de transferrina de macaco; círculos: unión a receptor de transferrina de ser humano; eje y: velocidad de disociación [1/s].

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES DE LA INVENCIÓN

En el presente documento se comunica una variante humanizada del anticuerpo de conejo 299 que muestra alta transcitosis en un ensayo de transcitosis de acuerdo con el ejemplo 8, que tiene reactividad cruzada con el receptor de transferrina de ser humano y de macaco, es decir, se une específicamente a ambos ortólogos del receptor de transferrina, que muestra buena tinción celular y que tiene una semivida similar (reflejada por la velocidad de disociación) que el anticuerpo murino 128.1 por el receptor de transferrina de macaco y por el receptor de transferrina humano.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor de transferrina humano, en donde el anticuerpo comprende

en el dominio variable de cadena pesada las HVR de SEQ ID NO: 66, 68 y 72,

y

en el dominio variable de cadena ligera las HVR de SEQ ID NO: 75, 76 y 78.

En una realización, el anticuerpo humanizado comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

En una realización, el anticuerpo humanizado es silente para función efectora.

En una realización, el anticuerpo humanizado se une específicamente al receptor de transferrina humano y al receptor de transferrina de macaco.

En una realización el anticuerpo humanizado es

a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG1 humana, o

b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG4 humana, o

a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG1 humana con las

mutaciones L234A, L235A y P329G,

d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y opcionalmente P329G,

e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V y Y349C en la otra cadena pesada respectiva, o

f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y opcionalmente P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V y Y349C en la otra cadena pesada respectiva.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo biespecífico que comprende

i) un primer sitio de unión que comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37,

y

ii) un segundo sitio de unión seleccionado entre

a) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 81 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 82, o

b) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 84, o

c) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 85 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 86, o

d) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 87 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 88, o

e) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 91 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 92, o

f) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 89 y un dominio

variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 90, o

g) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 93 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 94, o

h) un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 79 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 80.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo según se ha comunicado en el presente documento y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo tal como se ha comunicado en el presente documento para su uso como medicamento.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo tal como se comunica en el presente documento para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es el uso de un anticuerpo tal como se comunica en el presente documento en la fabricación de un medicamento.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un método de tratamiento que comprende administrar un anticuerpo tal como se comunica en el presente documento para tratar un trastorno neurológico.

**I. DEFINICIONES**

Un "armazón humano aceptor", para los fines del presente documento es un armazón que comprende la secuencia de aminoácidos del armazón del dominio variable de cadena ligera (VL) o armazón de un dominio variable de cadena pesada (VH) derivados de armazón de inmunoglobulina humana o un armazón consenso humano, tal como se define a continuación. Un armazón humano aceptor "derivado de" un armazón de inmunoglobulina humana o de un armazón consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas realizaciones, El armazón aceptor humano de VL es idéntico en secuencia al armazón de inmunoglobulina humana de VL o al armazón consenso humano.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar en general por su constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Las realizaciones específicas ilustrativas y ejemplares para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de las regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca varas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación a Fv, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La expresión anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena ligera y/o pesada procede de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera procede de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseída por su cadena pesada. Hay cuatro clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse

adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, $IgG_1$, $IgG_2$, $IgG_3$, $IgG_4$, $IgA_1$, e $IgA_2$. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman $\alpha$, $\delta$, $\varepsilon$, $\gamma$ y $\mu$, respectivamente.

Las "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con la clase de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; y activación de células B.

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

La expresión "región Fc" en el presente documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, tal como se describe en Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publicación NIH 91-3242.

"Marco conservada" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de restos de la región hipervariable (HVR). La región FR de un dominio variable consiste de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3, y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto", y "anticuerpo completo" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una

región-Fc tal como se ha definido en el presente documento.

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora", y "cultivo de células hospedadoras" se usan de manera intercambiable y se refiere a células en las cuales se han introducido ácidos nucleicos exógenos, incluyendo la progenie de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula primaria transformada y a la progenie derivada de esta independientemente del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula parental, pero puede contener mutaciones. Se incluye en el presente documento la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica explorada o seleccionada en la célula transformada originalmente.

Una "región marco conservada consenso humana" es una región marco conservada que representa los restos de aminoácidos de aparición más común en una selección de secuencias marco conservadas de VL o VH de inmunoglobulina humanas. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humanas es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Bethesda MD (1991), Publicación NIH 91-3242, Volúmenes 1-3. En una realización, para la VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat et al., *anteriormente citado.* En una realización, para la VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al., *anteriormente citado*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) se corresponden con aquellas de un anticuerpo humano, y todas o sustancialmente todas las Fr se corresponden a aquellas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido sometido a humanización.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones del dominio variable de un anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de

complementariedad" o "CDR") y forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables"), y/o contienen los restos en contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3).

Las HVR en el presente documento incluyen

(a) bucles hipervariables que aparecen en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3) (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);

(b) CDR que aparecen en los restos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), y 95-102 (H3) (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publicación NIH 91-3242);

(c) contactos con antígeno que aparecen en los restos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), y 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); y

(d) combinaciones de (a), (b), y/o (c), incluyendo los restos de aminoácidos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), y 94-102 (H3).

A menos que se indique lo contrario, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos FR) se numeran en el presente documento según Kabat et al.*, anteriormente citado*.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros, y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos como monos), conejos, y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado a partir de un componente de su ambiente natural. En algunas realizaciones, se purifica un anticuerpo a una pureza de más del 95 % o del 99 % según se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o por cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico o HPLC en fase reversa). Para una revisión de los métodos para determinar la pureza del anticuerpo, véase, por ejemplo, Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado a partir de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen ordinariamente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosomalmente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto para posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que aparecen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes presentes generalmente en cantidades menores. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante o antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe entenderse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación al método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación de fagos, y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose dichos métodos y otros métodos ilustrativos para preparar anticuerpos monoclonales en el presente documento.

Los "anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variantes. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas mediante puentes disulfuro. De N- a C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamado dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2, y CH3). De manera similar, de N- a C-terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominado dominio variable ligero o dominio variable de

cadena ligera, seguido de un dominio constante de cadena ligera (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" respecto de un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir los espacios en blanco, en caso necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en cuenta las posibles sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros necesarios para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc., y el código fuente, junto con las instrucciones para su uso, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrada con el n.º de Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir de su código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V 4.0 D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia para, con, o contra una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de restos de aminoácidos marcados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que en los casos donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A para B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B para A. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en esta sea efectivo, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administre la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se esté tratando, y se puede realizar tanto como profilaxis o durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de síntomas, la disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de evolución de la enfermedad, la mejora o alivio de la patología, y la remisión o un pronóstico mejorado. En algunas

realizaciones, se usan anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para frenar la progresión de una enfermedad.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo a su antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para explorar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628). La numeración de los restos de aminoácidos en la región variable (región variable de cadena ligera y de cadena pesada) se realizará de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Bethesda MD (1991), Publicación NIH 91-3242, Volúmenes 1-3).

El término "vector", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión".

La expresión "barrera hematoencefálica" (BHE) indica la barrera fisiológica entre la circulación periférica y el cerebro y la médula espinal que se forma mediante uniones estrechas entre las membranas plasmáticas endoteliales capilares, creando una estrecha barrera que restringe el transporte de moléculas al cerebro, incluso de moléculas muy pequeñas, tales como urea (60 Dalton). La BHE en el cerebro, la barrera hematoespinal en la médula espinal, y la barrera hematoretinal en la retina son barreras capilares contiguas en el SNC, y en el presente documento se citan de manera colectiva como barrera hematoencefálica o BHE. La BHE también abarca la barrera hemato-CSF (plexo coroide) en donde la barrera está compuesta de células ependimales en lugar de células endoteliales capilares.

La expresión "sistema nervioso central" (SNC) indica el complejo de tejidos nerviosos que controlan las funciones corporales, e incluye el cerebro y la médula espinal.

La expresión "receptor de la barrera hematoencefálica" (BHER) indica una proteína receptora extracelular unida a membrana expresada en células endoteliales cerebrales que es capaz de transportar moléculas a través de la BHE o usarse para transportar moléculas exógenas administradas. Los ejemplos de BHER incluyen, pero sin limitación, el receptor de transferrina (TfR), el receptor de insulina, el receptor de factor de crecimiento insulínico (IGF-R), los receptores de lipoproteínas de baja densidad incluyendo, sin limitación, la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y la proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), y el factor de crecimiento similar a factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). Un BHER ilustrativo es el receptor de transferrina (TfR).

La expresión "entidad efectora cerebral" indica una molécula que se va a transportar al cerebro a través de la BHE. La entidad efectora tiene típicamente una actividad terapéutica característica que se desea suministrar al cerebro. Las entidades efectoras incluyen fármacos para trastornos neurológicos y agentes citotóxicos, tales como, por ejemplo, polipéptidos y anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos dirigidos a una diana cerebral.

La expresión "entidad de unión monovalente" indica una molécula capaz de unirse específicamente y con un modo de unión monovalente a un BHER. El módulo y/o conjugado de lanzadera hematoencefálica, tal como se comunica en el presente documento, se caracteriza por la presencia de una sola unidad de una entidad de unión monovalente, es decir, el módulo de lanzadera hematoencefálica y/o el conjugado de la presente invención comprende exactamente una unidad de la entidad de unión monovalente. La entidad de unión monovalente incluye, pero sin limitación, polipéptidos, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, incluyendo Fab, Fab', fragmentos Fv, moléculas de anticuerpo monocatenarias, tales como, por ejemplo, Fab monocatenario, scFv. La entidad de unión monovalente puede, por ejemplo, ser una proteína de armazón modificada usando tecnologías del estado de la técnica, tales como presentación en fagos o inmunización. La entidad de unión monovalente también puede ser un polipéptido. En determinadas realizaciones, la entidad de unión monovalente comprende un dominio de Ig CH2-CH3 y un Fab monocatenario (scFab) dirigido a un receptor de la barrera hematoencefálica. El scFab está acoplado al extremo C-terminal del dominio de Ig

CH2-CH3 mediante un enlazador. En determinadas realizaciones, el scFab se dirige al receptor de transferrina.

La expresión "modo de unión monovalente" indica una unión específica al BHER en donde tiene lugar la interacción entre la entidad de unión monovalente y el BHER mediante un solo epítopo. El modo de unión monovalente evita cualquier dimerización/multimerización del BHER debido a un solo punto de interacción epitópico. El modo de unión monovalente evita que se altere la clasificación celular del BHER.

El término "epítopo" indica cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En determinadas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo, y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo.

El "receptor de transferrina" (TfR) es una glucoproteína transmembrana (con un peso molecular de aproximadamente 180.000 Da) que está compuesta de dos subunidades unidas mediante disulfuro (cada una de un peso molecular aparente de aproximadamente 90.000 Da) y está implicado en la captación de hierro en los vertebrados. En una realización, el TfR en el presente documento es un TfR humano que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se ha comunicado en Schneider et al. (Nature 311 (1984) 675 - 678).

La expresión "agente para obtención de imágenes" indica un compuesto que tiene una o más propiedades que permiten que se detecte presencia y/o localización de manera directa o indirecta. Los ejemplos de dichos agentes para la obtención de imágenes incluyen proteínas y compuestos de molécula pequeña que incorporan una entidad marcada que permite la detección.

Las expresiones "antígeno del SNC" y "diana cerebral" indican un antígeno y/o molécula expresada en el SNC, incluyendo el cerebro, que puede usarse como diana con un anticuerpo o molécula pequeña. Los ejemplos de dichos antígenos y/o molécula incluyen, sin limitación: beta secretasa 1 (BACE1), beta amiloide (Abeta), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de

leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma secretasa, receptor de muerte 6 (DR6), proteína precursora de amiloide (APP), receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), glucocerebrosidasa y caspasa 6.

La expresión "que se une específicamente" indica un anticuerpo que se une de manera selectiva o preferencial a un antígeno. La afinidad de unión se determina generalmente usando un ensayo convencional, tal como el análisis de Scatchard, o la técnica de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, usando BIACORE®).

La expresión "entidad de Ig CH2-CH3", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad proteica derivada de los dominios CH2 o CH3 de inmunoglobulina. La "entidad de Ig CH2-CH3" comprende dos polipéptidos "CH2-CH3" que forman un dímero. La inmunoglobulina puede ser IgG, IgA, IgD, IgE o IgM. En una realización, la entidad Ig CH2-CH3 se deriva de una inmunoglobulina IgG y se cita en el presente documento como "entidad IgG CH2-CH3". El término incluye la secuencia nativa de dominios CH2-CH3 y dominios CH2-CH3 variantes. En una realización, la "entidad de Ig CH2-CH3" procede de un dominio de cadena pesada de IgG CH2-CH3 que abarca desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácido en la región de dominio CH2-CH3 o la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, tal como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Un "conjugado" es una proteína de fusión de la presente invención conjugado a una o más moléculas heterólogas, incluyendo, pero sin limitación, un marcador, un fármaco para un trastorno neurológico o un agente citotóxico.

El término "enlazador" indica un enlazador químico o un enlazador peptídico monocatenario que conecta de manera covalente entidades diferentes del módulo de lanzadera de la barrera hematoencefálica y/o el polipéptido de fusión y/o el conjugado tal como se comunica en el presente documento. El enlazador conecta, por ejemplo, la entidad efectora cerebral a la entidad de unión monovalente. Por ejemplo, si la entidad de unión monovalente comprende una entidad de Ig CH2-CH3 y un scFab dirigido al receptor de barrera hematoencefálica, entonces el enlazador conjuga al scFab al extremo C-terminal de la entidad de Ig CH2-CH3. El enlazador que conjuga la entidad efectora cerebral a la entidad de unión monovalente (primer

enlazador) y el enlazador que conecta el scFab al extremo C-terminal del dominio de Ig CH2-CH3 (segundo enlazador) puede ser igual o diferente.

Pueden usarse enlazadores peptídicos monocatenarios que comprenden de uno a veinte restos de aminoácidos unidos mediante enlazadores peptídicos. En determinadas realizaciones, los aminoácidos se seleccionan entre los veinte aminoácidos de origen natural. En otras realizaciones determinadas, uno o más de los aminoácidos se seleccionan entre glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. En otras realizaciones, el enlazador es un enlazador químico. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador peptídico monocatenario con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 25 restos de aminoácidos, en una realización preferida, con una longitud de 32 a 50 restos de aminoácidos. En una realización, el enlazador peptídico es un enlazador (GxS)n, siendo G = glicina, S = serina, (x =3, n=8, 9 o 10) o (x = 4 y n= 6, 7 o 8), en una realización con x = 4, n = 6 o 7, en una realización preferida con x=4, n=7. En una realización, el enlazador es (G4S)4 (SEQ ID NO: 95). En una realización, el enlazador es (G4S)6G2 (SEQ ID NO: 96).

La conjugación puede llevarse a cabo usando una diversidad de enlazadores químicos. Por ejemplo, la entidad de unión monovalente o el polipéptido de fusión y la entidad efectora cerebral pueden conjugarse usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoilo)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de la entidad efectora tras su suministro al cerebro. Por ejemplo, se puede utilizar una molécula enlazadora lábil en medio ácido, una molécula enlazadora sensible a peptidasa, una molécula enlazadora fotolábil, una molécula enlazadora que contiene dimetilo o disulfuro (Chari et al, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; documento US 5.208.020).

La conjugación covalente puede ser directa o mediante un enlazador. En determinadas realizaciones, la conjugación directa es mediante la construcción de una fusión polipeptídica (es decir, mediante fusión genética de los dos genes que

codifican a la entidad de unión monovalente al BHER y la entidad efectora y se expresan una sola cadena polipeptídica). En determinadas realizaciones, la conjugación directa es mediante la formación de un enlace covalente entre un grupo reactivo en una de las dos partes de la entidad de unión monovalente contra el BHER y un grupo o aceptor correspondiente en la entidad efectora cerebral. En determinadas realizaciones, la conjugación directa es mediante modificación (por ejemplo, modificación genética) de uno de los dos módulos que se van a conjugar para incluir un grupo reactivo (como ejemplos no limitantes, un grupo sulfhidrilo o un grupo carboxilo) que forma una unión covalente con la otra molécula que se va a conjugar en las condiciones adecuadas. Como un ejemplo no limitante, una molécula (es decir, un aminoácido) con un grupo reactivo deseado (es decir, un resto de cisteína) puede introducirse en, por ejemplo, la entidad de unión monovalente para el anticuerpo para el BHER y formarse un enlace disulfuro con el fármaco neurológico. Los métodos para la conjugación covalente de ácidos nucleicos a proteínas también se conocen en la técnica (es decir, fotorreticulación, véase, por ejemplo, Zatsepin et al. Russ. Chem. Rev. 74 (2005) 77-95). La conjugación también puede llevarse a cabo usando una diversidad de enlazadores. Por ejemplo, pueden conjugarse una entidad de unión monovalente y una entidad efectora usando una diversidad de agentes de unión de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoilo)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). También pueden usarse enlazadores peptídicos, compuestos de uno a veinte restos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. En algunas de estas realizaciones, los restos de aminoácidos se seleccionan entre los veinte aminoácidos de origen natural. En otras de estas realizaciones, uno o más de los restos de aminoácidos se seleccionan entre glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de la entidad efectora tras su suministro al cerebro. Por ejemplo, se puede utilizar una molécula enlazadora lábil en medio ácido, una molécula enlazadora sensible a peptidasa, una molécula enlazadora fotolábil, una molécula enlazadora que contiene dimetilo o disulfuro (Chari et al, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; documento US 5.208.020).

## II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

Las constantes disociación en equilibrio ($K_D$) se usan comúnmente para describir interacciones moleculares. Se usa como una medición de la fuerza de interacción de dos moléculas (por ejemplo, la afinidad) entre sí. Por tanto, el valor de $K_D$ es una medida de la fuerza de una interacción biomolecular.

Pero como tal, el valor de $K_D$ no describe la cinética de la interacción molecular, es decir, por una parte no puede deducirse a partir del valor de $K_D$ con qué velocidad se unen las dos moléculas entre sí (constante de velocidad de asociación o "velocidad de asociación") y por otra parte cómo de rápido se disocian las moléculas (constante de velocidad de disociación o "velocidad de disociación"). La caracterización de las interacciones biomoleculares solo por su valor de $K_D$ ignora el hecho de que un valor de $K_D$ idéntico puede formarse a partir de velocidades de asociación y disociación (que difieren en órdenes de magnitud), ya que el valor de $K_D$ es la relación de los mismos.

Sin embargo, las velocidades de asociación y disociación son importantes para caracterizar el comportamiento de unión de las moléculas. La velocidad de disociación es especialmente importante porque caracteriza la duración de la unión de, por ejemplo, un anticuerpo a su antígeno. Una velocidad de disociación prolongada se correlaciona con una lenta disociación del complejo formado, mientras que una velocidad de disociación corta se correlaciona con una rápida disociación.

Para tener una interacción de larga duración (es decir, que requiere de una dosificación menos frecuente) o a medida (por ejemplo, que depende de las condiciones circundantes) hay que determinar experimentalmente las velocidades de disociación. Esto es aún más importante ya que es prácticamente imposible predecir la velocidad de disociación. Además, la correlación entre la velocidad de disociación y la afinidad de unión es baja, tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, debido al hecho de que el valor de $K_D$ es la proporción de la velocidad de unión y de disociación, incluso las moléculas de unión débiles pueden permanecer unidas a su diana durante mucho tiempo mientras que las moléculas de unión fuertes pueden disociarse rápidamente.

Un cuello de botella típico en los proyectos de generación de anticuerpos es la clasificación de los muchos candidatos obtenidos después del paneo basándose en la fuerza de unión del anticuerpo. Idealmente, dicho método funcionará antes del marcaje de los antígenos y con lisados bacterianos en bruto. Ylera, F., et al. (Anal.

Biochem. 441 (2013) 208-213) comunicaron un método para la exploración de la velocidad de disociación para seleccionar anticuerpos anti-fármaco de alta afinidad de lisados de *Escherichia coli* en bruto que contenían fragmentos Fab monovalentes. Seleccionaron la velocidad de disociación como el parámetro de clasificación debido a que, entre otras cosas, la velocidad de disociación es independiente de la concentración. Seleccionaron el formato monovalente para evitar los efectos de avidez durante la clasificación de la velocidad de disociación y la determinación de la afinidad ya que se observarían con IgG completas. Ylera et al. han descubierto que el clon con la mejor k de velocidad de disociación se identificó mediante la etapa de clasificación de la k de disociación, pero no podrían haberlo identificado usando solo la fuerza de señal de ELISA como criterio de selección.

Murray, J.B., et al. (J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850) comunicaron la exploración de la velocidad de disociación (ORS) mediante resonancia de plasmón superficial como un método eficaz para muestrear cinéticamente el espacio químico de coincidencia a líder a partir de productos de reacción no purificados. Se explica que la constante de velocidad de disociación kd (velocidad de disociación) es el componente de la unión de ligando-proteína con el potencial más significativo para mejorar la potencia del compuesto. Los autores explican que medir cinéticamente la afinidad mediante un programa de descubrimiento de fármacos es más informativo que la determinación de la afinidad de equilibrio en estado estacionario. Por ejemplo, no se reconocería un compuesto con una velocidad de asociación y de disociación 10 veces más lenta como diferente si se evaluase mediante medidas de afinidad en equilibrio. Además, los autores han descubierto que los datos determinados con el instrumento BIAcore T2000 muestra una diferencia media en las kd entre muestras en bruto y puras del 19 %, de manera similar, los datos determinados con el instrumento BIAcore T100, más antiguo, tenían una diferencia del 15 %. Los autores observan que las kd varían un promedio de solo el 30 % cuando se comparan entre instrumentos y a lo largo del tiempo. Esto demuestra que la contaminación continuada, el almacenamiento a largo plazo y los diferentes equipos tienen un efecto modesto en las kd observadas. De hecho, estas pequeñas desviaciones en las kd reflejan estrechamente las diferencias observadas en estudios en múltiples laboratorios en donde se ha comunicado que la variabilidad observada es de entre el 14 % al 40 %, dependiendo del sistema (Murray, J.B., et al., J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850; Katsamba, P.S., et al., Anal. Biochem. 352 (2006) 208-221).

En el documento WO 2014/189973 se comunican anticuerpos anti-receptor de transferrina y métodos de uso. Se comunica además que usar como diana un

receptor de la BHE con un anticuerpo tradicional específico de alta afinidad generalmente da como resultado un aumento limitado en el transporte de la BHE. Se ha observado además que la magnitud de la captación del anticuerpo y su distribución en el SNC es inversamente proporcional a su afinidad de unión por el receptor de la BHE entre los anticuerpos anti-BHE estudiados. Por ejemplo, un anticuerpo de baja afinidad para el receptor de transferrina (TfR) dosificado a niveles de dosis terapéutica mejora en gran medida el transporte por la BHE y la retención en el SNC del anticuerpo anti-TfR en relación con un anticuerpo anti-TfR de mayor afinidad, y hace posible obtener más fácilmente concentraciones terapéuticas en el SNC (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43). La prueba de dicho transporte por la BHE se logró usando un anticuerpo biespecífico que se une tanto a TfR como a la enzima escisora de la proteína amiloide precursora (APP), β-secretasa (BACE1). Una sola dosis sistémica del anticuerpo biespecífico anti-TfR/BACE1 diseñado usando un anticuerpo de baja afinidad no solo dio como resultado una captación significativa del anticuerpo en el cerebro, sino que también redujo drásticamente los niveles de Aβ1-40 cerebral en comparación con el solo el anticuerpo monoespecífico anti-BACE1, lo que sugiere que la penetración en la BHE afecta a la potencia del anticuerpo anti-BACE1 (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43; Yu et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra44).

Los datos y experimentos disponibles destacan varios mecanismos causales detrás del aumento de captación de un anticuerpo en el SNC usando una estrategia de anticuerpo de menor afinidad.

En primer lugar, los anticuerpos de alta afinidad anti-receptor de la BHE (BHER) (por ejemplo, el anticuerpo anti-TfR de Atwal et al. y de Yu et al., anteriormente citado) limita la captación en el cerebro saturando el BHE-R en la vasculatura cerebral, reduciendo de este modo la cantidad total de anticuerpo captado en el cerebro y también restringiendo su distribución a la vasculatura. Sorprendentemente, reducir la afinidad por el BHE-R mejora la captación y distribución cerebral, observándose un cambio robusto en la localización de la vasculatura a las neuronas y de la neurocápsula asociada distribuida en el SNC. Se ha descubierto que la afinidad tiene que encontrarse por debajo de un nivel máximo y por encima de un determinado nivel mínimo.

En segundo lugar, se ha propuesto que la menor afinidad del anticuerpo por el BHE-R dificulta la capacidad del anticuerpo para volver al lado vascular de la BHE a través del BHE-R desde el lado del SNC de la membrana debido a que la afinidad general del anticuerpo por el BHE-R es baja y la concentración local del anticuerpo

en el lado del SNC de la BHE no es saturante debido a la rápida dispersión del anticuerpo en el compartimento del SNC.

En tercer lugar, *in vivo*, y tal como se observa para el sistema del TfR, los anticuerpos con menor afinidad por el BHE-R no se eliminan del sistema de una manera tan eficaz como aquellos con mayor afinidad por el BHE-R, y por lo tanto permanecen en mayores concentraciones circulantes que sus homólogos de mayor afinidad. Esto es ventajoso debido a que los niveles circulantes de anticuerpo del anticuerpo de menor afinidad se mantienen a niveles terapéuticos durante un periodo de tiempo más prolongado que el anticuerpo de mayor afinidad, lo que por consiguiente mejora la captación del anticuerpo en el cerebro durante un periodo de tiempo más prolongado. Además, esta mejora en la exposición tanto plasmática como cerebral puede reducir la frecuencia de dosificación en la clínica, lo que podría tener un beneficio potencial no solo para el cumplimiento y la conveniencia del paciente, sino también en reducir cualquier efecto secundario potencial de los efectos fuera de la diana del anticuerpo y/o de un compuesto terapéutico acoplado al mismo.

Estos estudios anteriores utilizaron anticuerpos de ratón que se unían específicamente a TfR de ratón, pero que no reconocían específicamente a TfR de primate o de ser humano. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan anticuerpos y partes funcionales de los mismos que no reconocen específicamente a TfR de primate, específicamente de macaco, y de ser humano, para facilitar los estudios se seguridad y eficacia en primates con los anticuerpos antes de su uso terapéutico o diagnóstico en seres humanos.

Se hace necesaria una evaluación no clínica exhaustiva de los anticuerpos monoclonales (mAb) previstos para su aplicación terapéutica debido a la creciente complejidad de los aspectos del diseño de anticuerpos y la variabilidad inducida por la diversidad de sistemas celulares de producción recombinante para la generación de anticuerpos. Además, la compleja estructura, las funciones biológicas únicas y las mayores semividas de los mAb en comparación con los fármacos de molécula pequeña tradicionales se suman a las consideraciones de seguridad además de las preocupaciones debidas al uso clínico prolongado de los mAb para el tratamiento de enfermedades crónicas (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., et al., Mol. Cells 20 (2005) 17-29).

El objetivo general de los estudios no clínicos para mAb es definir las propiedades toxicológicas del mAb en cuestión y proporcionar información para el desarrollo del

producto. Los objetivos principales de la evaluación no clínica son (1) identificación de órganos diana respecto de su toxicidad y determinar si la toxicidad es reversible después del tratamiento, (2) identificación de una dosis inicial segura para ensayos clínicos de fase I y posteriores esquemas de escalado de dosis, (3) proporcionar información para controlar parámetros de seguridad en los ensayos clínicos y (4) proporcionar datos de seguridad para apoyar afirmaciones en el prospecto del producto. Para lograr estos objetivos, se llevan a cabo estudios no clínicos tanto *in vitro* como *in vivo* dirigidos a definir y entender las propiedades farmacológicas del anticuerpo (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., En: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals“; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

Para la evaluación no clínica satisfactoria de un mAb, deben seleccionarse para ensayo las especies animales más relevantes (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Una especie relevante es una en la que el anticuerpo es farmacológicamente activo, el antígeno diana debe estar presente o expresarse y el perfil de reactividad cruzada de tejidos debe ser similar a seres humanos (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126; Subramanyam, M. y Mertsching, E., En: Cavagnaro J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., et al., En: Cavagnaro, J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Usando ensayos inmunoquímicos o funcionales, puede identificarse una especie animal relevante que expresa el epítopo deseado y que demuestra un perfil de reactividad cruzada de tejidos similar a los tejidos humanos (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., En: Cavagnaro, J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Los estudios de reactividad cruzada de especie, que son útiles en este proceso, implican un estudio inmunohistoquímico de tejidos de una diversidad de especies usando micromatrices de tejido multi-especie comercialmente disponibles (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., En: Cavagnaro, J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Como alternativa, la evaluación de la unión de anticuerpos a células de estos animales mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) es típicamente más sensible que el análisis inmunohistoquímico de secciones de tejido (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. y Mertsching, E., En: Cavagnaro J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205). Deben

compararse las secuencias de ADN y aminoácidos del antígeno diana entre especies; debe determinarse la homología entre especies (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. y Mertsching, E., En: Cavagnaro J.A. (Ed.); "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals". Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Además, deben ser comparables la biodistribución, función y estructura del antígeno entre las especies animales relevantes y los seres humanos para permitir la evaluación de la toxicidad que surge de la unión antígeno diana, que se cita como toxicidad en la diana (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20). Además, las fuertes similitudes en la distribución tisular del antígeno diana en las especies animales y seres humanos hace más posible que la toxicidad identificada en los órganos diana prediga toxicidades potenciales en seres humanos. La falta de similitud en la distribución tisular de antígeno entre las especies animales y seres humanos no impide completamente el uso de especies animales para estudios de toxicidad, pero estas diferencias tienen que tomarse en consideración para la evaluación de riesgo en seres humanos. En cuanto a la densidad o afinidad del antígeno, tampoco es necesaria una equivalencia absoluta entre el modelo animal y los seres humanos. Debe incluirse una justificación en cuanto a la relevancia de las especies seleccionadas para las pruebas de toxicidad en la presentación a las agencias reguladoras. Si solo se usa una especie para la evaluación se seguridad, es obligatorio un resumen de los experimentos que demuestran la ausencia de especies relevantes adicionales (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11).

Si el anticuerpo monoclonal previsto para un uso terapéutico no tiene reactividad cruzada entre especies, debería usarse un anticuerpo subrogado o una especie diferente para el modelo. Por tanto, los anticuerpos subrogados son una solución potencial para las limitadas pruebas de seguridad posibles con anticuerpos monoclonales humanizados con reactividad cruzada entre especies restringida. Sin embargo, actualmente no hay criterios definidos mediante los cuales debería juzgarse un anticuerpo subrogado antes de su uso para determinar cuestiones de seguridad para el agente clínico (Regulatory Toxicology and Pharmacology, volumen 40, 3ª edición, Diciembre de 2004, Páginas 219-226).

Por tanto, para identificar un modelo animal para un mAb particular, tienen que tenerse en cuenta las consideraciones anteriores. Sin embargo, es necesario que el mAb en cuestión tenga reactividad cruzada con el antígeno diana de la especie de ensayo. De lo contrario, no podría usarse incluso la especie de ensayo más adecuada. Por lo tanto, existe la necesidad de mAb que no tengan reactividad

cruzada intra-especie pero que tengan reactividad cruzada entre especies por su diana en seres humanos y la especie prevista para los ensayos no clínicos.

**A. Anticuerpos anti-transferrina ejemplares**

En el presente documento se comunican anticuerpos anti-receptor de transferrina que tienen una velocidad de disociación para la unión al receptor de transferrina humano que se encuentra dentro de un determinado intervalo para asegurar un uso como lanzadera de la BHE adecuado. Se ha observado que este intervalo se define por un lado mediante la velocidad de disociación del anticuerpo murino anti-receptor de transferrina 128.1 (las secuencias de aminoácidos del dominio variable se proporcionan en las SEQ ID NO: 64 y 65) determinada mediante resonancia de plasmón superficial por el receptor de transferrina de macaco y por otro lado por un 5 % de la velocidad de disociación (es decir, una disociación 20 veces más lenta). En una realización, la velocidad de disociación por el receptor de transferrina humano es de entre, e incluyendo, 0,1 1/s y 0,005 1/s.

Los anticuerpos humanizados del clon 299, tal como se comunica en el presente documento, no fueron capaces de aplicar técnicas de humanización convencionales. Se hizo necesario introducir mutaciones no convencionales en la secuencia de aminoácidos para obtener un anticuerpo humanizado con velocidades de disociación al receptor de transferrina dentro del intervalo previsto de, e incluyendo, 0,1 1/s y 0,005 1/s. Esto es especialmente importante ya que los anticuerpos tal como se comunican en el presente documento se están desarrollando para atravesar la barrera hematoencefálica humana para hacer de lanzadera de una carga terapéutica al cerebro.

Se ha descubierto que para obtener un anticuerpo humanizado adecuado y con posibilidad de desarrollo tienen que reemplazarse dos restos de aminoácido de cisteína en la cadena ligera del anticuerpo de conejo progenitor por un resto de aminoácido de prolina y de asparagina, respectivamente. Además, para encontrarse dentro del intervalo de velocidad de disociación deseado, hubo que reemplazar un resto de serina presente en medio de la CDRL3 de conejo por un resto de alanina.

Además, se ha descubierto que es ventajoso cambiar tres restos de aminoácido en la cadena pesada en las posiciones 65, 100g y 105 (numeración de acuerdo con Kabat).

Todas las numeraciones usadas en el presente documento se basan en el esquema de numeración de dominio variable de Kabat.

El anticuerpo de conejo anti-transferrina, clon 299, mostró propiedades comparables a las del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1. Esto puede observarse a partir de la siguiente tabla.

| origen | carga de transcitosis [pg] | % de transcitosis basolateral | basolateral total [pg] | apical total [pg] | suma transportada [pg] |
|---|---|---|---|---|---|
| Mab 128.1 | 2226 | 34 | 757 | 1229 | 1986 |
| clon-299 | 2773 | 36 | 998 | 1346 | 2344 |
| origen | carga % de mAb 128.1 | % basolateral total de mAb 128.1 | % apical apical de mAb 128.1 | % de suma transportada de mAb 128.1 | CE50 [ng/ml] FACS hTfR-CHO |
| Mab 128.1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96 |
| clon-299 | 125 | 132 | 110 | 118 | 275 |
| origen | media geo. máx hTfR-CHO | CE50 [ng/ml] FACS cyhTfR | media geo. máx Cyno hTfR-CHO | relación de CE50 Cyno/humano | relación máx Cyno/humano |
| Mab 128.1 | 78200 | 314 | 52100 | 3,3 | 0,6 |
| clon-299 | 55600 | 241 | 52000 | 0,9 | 1,0 |
| origen | vel. dis. BIAcore huTfR [1/s] | t1/2 BIAcore huTfR [min] | vel. dis. BIAcore cyTfR [1/s] | t1/2 BIAcore Cyno TfR [min] | relación t1/2 humano/Cyno |
| Mab 128.1 | 6,06E-04 | 19 | 5,47E-02 | 0,2 | 90,2 |
| clon-299 | 6,16E-04 | 19 | 2,77E-04 | 42 | 0,4 |

En la siguiente tabla se muestran las velocidades de disociación de variantes de humanización del dominio variable de cadena ligera de conejo del clon 299 en combinación con variantes de humanización del dominio variable de cadena pesada de conejo del clon 299. El compañero de unión fue el receptor de transferrina humano (determinada a 25 ℃).

| VH → VL↓ | 0 (con) | 1 | 2 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 (con) | 4,34E-04 | 9,08E-04 | 8,06E-04 | 7,72E-04 | 6,3E-04 | 5,15E-04 | 4,06E-04 | 9,01E-04 | 9,05E-04 | 9,21E-04 |
| 1 | 5,69E-03 | 1,00E-03 | 1,00E-03 | 1,00E-03 | 1,00E-03 | 7,52E-03 | 3,19E-03 | 6,94E-03 | 1,00E-03 | 1,00E-03 |
| 2 | 1,25E-03 | 2,86E-03 | 2,75E-03 | 2,41E-03 | 1,87E-03 | 1,31E-03 | 1,01E-03 | 3,99E-03 | 3,85E-03 | 6,35E-03 |
| 3 | 1,32E-03 | 4,31E-03 | 3,84E-03 | 3,16E-03 | 2,82E-03 | 1,45E-03 | 1,00E-03 | 4,17E-03 | 5,65E-03 | 5,86E-03 |
| 4 | 1,36E-03 | 2,56E-03 | 2,63E-03 | 2,38E-03 | 1,87E-03 | 1,25E-03 | 7,88E-04 | 2,70E-03 | 3,88E-03 | 3,11E-03 |
| 5 | 1,94E-03 | 2,71E-03 | 2,62E-03 | 2,53E-03 | 1,66E-03 | 1,35E-03 | 1,07E-03 | 3,50E-03 | 4,56E-03 | 5,82E-03 |
| 6 | 1,90E-03 | 5,38E-03 | 5,55E-03 | 4,64E-03 | 3,06E-03 | 1,97E-03 | 1,40E-03 | 6,83E-03 | 6,71E-03 | 7,05E-03 |
| 7 | 4,63E-03 | 7,33E-03 | 7,50E-03 | 6,97E-03 | 5,63E-03 | 3,66E-03 | 2,31E-03 | 7,61E-03 | 7,81E-03 | 7,71E-03 |
| 8 | 1,39E-03 | 4,85E-03 | 3,94E-03 | 3,78E-03 | 3,01E-03 | 1,72E-03 | 1,16E-03 | 5,23E-03 | 5,52E-03 | 5,31E-03 |
| 9-NYA | 1,41E-03 | 2,46E-03 | 2,21E-03 | 2,03E-03 | 1,41E-03 | 1,21E-03 | 1,01E-03 | 2,52E-03 | 2,42E-03 | 2,19E-03 |
| 10 | 1,88E-03 | 6,77E-03 | 6,49E-03 | 6,53E-03 | 4,55E-03 | 2,64E-03 | 1,73E-03 | 7,19E-03 | 7,16E-03 | 7,79E-03 |
| 12 | 5,41E-03 | 7,05E-03 | 8,14E-03 | 1,00E-03 | 7,78E-03 | 7,75E-03 | 6,72E-03 | 1,00E-03 | 7,87E-03 | 1,00E-03 |
| 14 | 1,78E-03 | 2,99E-03 | 2,44E-03 | 2,33E-03 | 2,20E-03 | 1,53E-03 | 1,04E-03 | 3,32E-03 | 3,51E-03 | 5,46E-03 |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 15 | 6,63E-03 | 6,69E-03 | 6,38E-03 | 6,37E-03 | 4,21E-03 | 2,73E-03 | 1,81E-03 | 7,39E-03 | 7,09E-03 | 7,76E-03 |
| 17 | 1,49E-03 | 7,56E-03 | 7,12E-03 | 7,45E-03 | 7,17E-03 | 1,87E-03 | 1,12E-03 | 4,25E-03 | 7,55E-03 | 7,27E-03 |
| VH → VL↓ | 13 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23-DANG |
| 0 (con) | 4,82E-04 | 7,3E-04 | 6,53E-04 | 4,13E-04 | 1,09E-03 | 1,00E-03 | 1,11E-03 | 5,65E-04 | 5,06E-04 | 3,38E-04 |
| 1 | 1,00E-03 | 7,72E-03 | 7,71E-03 | 4,33E-03 | 1,00E-03 | 1,00E-03 | 1,00E-03 | 7,71E-03 | 5,78E-03 | 2,80E-03 |
| 2 | 2,46E-03 | 2,16E-03 | 1,97E-03 | 1,05E-03 | 4,89E-03 | 7,69E-03 | 5,25E-03 | 1,38E-03 | 1,26E-03 | 7,15E-04 |
| 3 | 2,77E-03 | 2,07E-03 | 1,73E-03 | 8,43E-04 | 6,65E-03 | 1,00E-03 | 7,15E-03 | 1,94E-03 | 1,43E-03 | 7,83E-04 |
| 4 | 1,30E-03 | 1,34E-03 | 1,27E-03 | 7,23E-04 | 3,35E-03 | 1,00E-03 | 4,36E-03 | 1,46E-03 | 1,18E-03 | 7,61E-04 |
| 5 | 2,18E-03 | 2,14E-03 | 2,23E-03 | 1,23E-03 | 3,49E-03 | 1,00E-03 | 3,52E-03 | 1,37E-03 | 1,41E-03 | 8,80E-04 |
| 6 | 3,65E-03 | 3,50E-03 | 3,39E-03 | 1,71E-03 | 6,74E-03 | 1,00E-03 | 6,06E-03 | 2,07E-03 | 2,14E-03 | 1,16E-03 |
| 7 | 6,68E-03 | 5,43E-03 | 5,25E-03 | 2,33E-03 | 7,66E-03 | 1,00E-03 | 7,14E-03 | 2,38E-03 | 3,37E-03 | 1,55E-03 |
| 8 | 2,47E-03 | 2,09E-03 | 1,97E-03 | 1,11E-03 | 6,77E-03 | 6,71E-03 | 6,58E-03 | 1,74E-03 | 1,65E-03 | 9,41E-04 |
| 9-NYA | 1,39E-03 | 1,42E-03 | 1,36E-03 | 9,34E-04 | 2,21E-03 | 6,17E-03 | 1,89E-03 | 1,13E-03 | 1,26E-03 | 7,69E-04 |
| 10 | 5,89E-03 | 3,99E-03 | 4,24E-03 | 1,88E-03 | 7,46E-03 | 1,00E-03 | 7,05E-03 | 2,11E-03 | 2,09E-03 | 1,20E-03 |
| 12 | 7,85E-03 | 7,64E-03 | 7,54E-03 | 2,84E-03 | 1,00E-03 | 1,00E-03 | 1,00E-03 | 7,54E-03 | 6,44E-03 | 1,87E-03 |
| 14 | 2,22E-03 | 1,94E-03 | 1,75E-03 | 1,05E-03 | 3,00E-03 | 7,96E-03 | 2,39E-03 | 1,03E-03 | 1,12E-03 | 7,33E-04 |
| 15 | 7,11E-03 | 6,03E-03 | 4,77E-03 | 1,56E-03 | 7,58E-03 | 1,00E-03 | 7,85E-03 | 1,92E-03 | 1,79E-03 | 9,86E-04 |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 17 | 3,39E -03 | 1,69E -03 | 1,66E -03 | 9,88E -04 | 5,30E -03 | 1,00E -03 | 4,57E -03 | 9,97E -04 | 9,38E -04 | 6,94E -04 |

Se seleccionó la combinación de VH23 con VL9 como punto de partida para modificaciones adicionales para desarrollar un sitio de unión que refleja más estrechamente las propiedades de unión del anticuerpo 128.1 al receptor de transferrina de macaco con respecto a la unión al receptor de transferrina.

En la siguiente tabla se muestran por comparación las velocidades de disociación de diferentes variantes ejemplares de VH23 y VL9 así como otras variantes diferentes de humanización de dominio variable para el receptor de transferrina (determinadas de acuerdo con el ejemplo 14, 25 ℃).

| | VK9-NYA | VK9-SYA | VK9-GYS | VK9-CYS | VH567-P…NYA | VK12-HYS | VK17-TYS | VK15-AYS | VK2-SYS | VK6-SYS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VH23-DANG | 8,83 E-03 | | 3,96 E-03 | | 4,62 E-03 | 1,53 E-02 | 2,29 E-03 | 6,97 E-03 | 5,22 E-03 | 1,32 E-02 |
| VH23-DASG | 3,95 E-02 | 4,84 E-04 | 3,73 E-03 | 2,33 E-03 | | | | | | |
| VH23-DAQG | 1,49 E-02 | 7,55 E-04 | 3,75 E-03 | 1,51 E-03 | | | | | | |
| VH9-DANG | 1,82 E-03 | | | 6,52 E-03 | | | | | 4,02 E-02 | |
| VH9-DAQG | 1,25 E-03 | | | | | | | | | |
| VH7-DANG | | | | | | | | | | 3,08 E-02 |

referencia: 128.1 = 7,78E-02 (determinada para el receptor de transferrina de macaco).

En la siguiente tabla se muestran los datos cinéticos de diferentes variantes ejemplares de VH23 y VL9 en comparación (determinadas de acuerdo con el ejemplo 13).

| **Ensayo BIAcore a 25 ℃** | **TfR** | **kd [$s^{-1}$]** | **ka [$s^{-1}M^{-1}$]** | **kD [M]** |
|---|---|---|---|---|
| Mab 128.1 | macaco | 7,33E-02 | 5,41E+05 | 1,36E-07 |
| VH23-DASG/VL09-NYA | humano | 3,95E-02 | 8,83E+04 | 4,47E-07 |
| VH23-DAQG/VL09-NYA | humano | 1,37E-02 | 1,21E+05 | 1,13E-07 |
| VH23-DANG/VL09-NYA | humano | 8,83E-03 | 1,55E+05 | 5,72E-08 |

En la siguiente tabla se muestran las velocidades de disociación de variantes de humanización del dominio variable de cadena ligera murina del clon 494 en combinación con variantes de humanización del dominio variable de cadena pesada murino del clon 494. El compañero de unión fue el receptor de transferrina humano.

| VH→<br>VL↓ | 0 (mu) | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 (mu) | 1,36E-04 | 1,37E-04 | 1,56E-04 | 1,48E-04 | 1,77E-04 |
| 1 | 3,70E-04 | 4,10E-04 | 4,54E-04 | 4,76E-04 | 4,48E-04 |
| 2 | 3,64E-04 | 3,99E-04 | 4,26E-04 | 4,15E-04 | 4,38E-04 |
| 3 | 3,39E-04 | 3,86E-04 | 4,30E-04 | 4,34E-04 | 4,52E-04 |
| 4 | 5,42E-04 | 6,57E-04 | 7,03E-04 | 6,83E-04 | 7,05E-04 |
| 5 | 5,44E-04 | 6,84E-04 | 7,17E-04 | 7,17E-04 | 7,28E-04 |
| 6 | 3,81E-04 | 4,86E-04 | 5,27E-04 | 5,50E-04 | 5,52E-04 |
| 7 | 2,32E-04 | 2,74E-04 | 2,99E-04 | 3,06E-04 | 3,26E-04 |

En más detalle, en un aspecto, la invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que el anticuerpo anti-receptor de transferrina, tal como se ha comunicado en el presente documento, puede usarse como módulo de lanzadera de la barrera hematoencefálica para suministrar una entidad efectora cerebral a través de la barrera hematoencefálica al cerebro. En determinadas realizaciones, el módulo de lanzadera de barrea hematoencefálica es una entidad de unión monovalente que se une específicamente al receptor de transferrina. Los anticuerpos anti-receptor de transferrina tal como se comunican en el presente documento cuando se usan como módulo de lanzadera de barrera hematoencefálica son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer con co-

morbilidad de enfermedad de Parkinson.

Se ha descubierto que un anticuerpo que comprende el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 37 refleja, respecto del receptor de transferrina humana, las propiedades de unión del anticuerpo murino 128.1 respecto del receptor de transferrina de macaco en lo referente a la velocidad de disociación.

Por consiguiente, un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo aislado que se une al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco (cyTfR), en donde el anticuerpo tiene una velocidad de disociación determinada mediante resonancia de plasmón superficial para el receptor de transferrina humano de entre 0,1 1/s y 0,005 1/s.

Otro aspecto tal como se comunica en el presente documento es el uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco (cyTfR), en donde el anticuerpo tiene una velocidad de disociación determinada mediante resonancia de plasmón superficial para el receptor de transferrina humano de entre 0,1 1/s y 0,005 1/s, para el suministro de una entidad terapéutica a través de la barrera hematoencefálica.

En una realización, la velocidad de disociación se determina a 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 y 0 nM.

En una realización, la velocidad de disociación se determina usando una placa de resonancia de plasmón superficial con una superficie de biotina y un tampón de ejecución de 1xPBS suplementado con cloruro de sodio 250 mM a un caudal de 10 µl/min.

En una realización, la asociación se controla durante 180 segundos y la disociación se controla durante 600 segundos.

En una realización, la velocidad de disociación se determina en un aparato BIAcore T200.

En una realización, la velocidad de disociación es de entre 0,08 1/s y 0,008 1/s.

En una realización de todos los aspectos, la velocidad de disociación se determina a 25 ℃.

En una realización de todos los aspectos, la velocidad de disociación es la velocidad de disociación determinada a 25 ℃.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco (cyTfR), que comprende i) un dominio variable de cadena pesada humanizado derivado del dominio variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 01 y ii) un dominio variable de cadena ligera humanizado derivado del dominio variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 26, en donde el dominio variable de cadena ligera tiene en la posición 80 un resto de aminoácido de prolina (P), en la posición 91 un resto de aminoácido de asparagina (N) y en la posición 93 un resto de aminoácido de alanina (A) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene además en la posición 100g del dominio variable de cadena pesada un resto de aminoácido de serina (S) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene además en la posición 65 del dominio variable de cadena pesada un resto de aminoácido de serina (S) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una realización, el anticuerpo tiene además en la posición 105 del dominio variable de cadena pesada un resto de aminoácido de glutamina (Q) (numeración de acuerdo con Kabat).

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco (cyTfR), que comprende i) un dominio variable de cadena pesada humanizado derivado del dominio variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 01 y ii) un dominio variable de cadena ligera humanizado derivado del dominio variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 26, en donde el anticuerpo tiene una velocidad de disociación en unidades 1/s por el receptor de transferrina humana que es igual o menor que (es decir, como máximo) la velocidad de disociación en unidades 1/s del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 por el receptor de transferrina de macaco, en donde las velocidades de disociación se determinan mediante resonancia de plasmón superficial, y en donde el anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 tiene un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 64 y un dominio variable de

cadena ligera de SEQ ID NO: 65.

En una realización, el anticuerpo tiene una velocidad de disociación en unidades 1/s por el receptor de transferrina humano que es i) igual a o menor que (es decir, como máximo) la velocidad de disociación en unidades 1/s del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 por el receptor de transferrina de macaco e ii) igual que o más de (es decir, al menos) un 5 % de la velocidad de disociación en unidades 1/s del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 por el receptor de transferrina de macaco.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco (cyTfR). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-receptor de transferrina

- se une al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco (cyTfR);
- tiene una velocidad de disociación en unidades 1/s por el receptor de transferrina humano que es igual a o menor a (es decir, como máximo) a la del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 por el receptor de transferrina de macaco, en donde las velocidades de disociación se determinan mediante resonancia de plasmón superficial, y en donde el anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 tiene un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 64 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 65;
- se une con una velocidad de disociación por el receptor de transferrina humana que es de entre, incluyendo, 0,1 1/s y 0,005 1/s.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis HVR seleccionadas entre (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, 72 o 73; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias HVR de VH seleccionadas entre (a) una

HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o 72 o 73. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias HVR de VH seleccionadas entre (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias HVR de VH seleccionadas entre (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73. En una realización, el anticuerpo comprende una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o 72 o 73. En otra realización, el anticuerpo comprende una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o 72 o 73 y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o 72 o 73, una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78, y una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68. En una realización adicional, el anticuerpo comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias HVR de VL seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78. En una realización, el anticuerpo comprende (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias HVR de VH

seleccionadas entre (i) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, (ii) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o 72 o 73; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias HVR de VL seleccionadas entre (i) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75, (ii) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76, y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (f) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 78.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, un anticuerpo anti-receptor de transferrina está humanizado. En una realización, un anticuerpo anti-receptor de transferrina comprende HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y además comprende una región marco conservada humana aceptora, por ejemplo, una región marco conservada de inmunoglobulina humana o una región marco conservada consenso humana.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-receptor de transferrina comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y que tiene aproximadamente la misma velocidad de disociación que un anticuerpo que comprende la secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 24. En determinadas realizaciones, una secuencia VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones, o eliminaciones en relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende esa secuencia retiene la capacidad para unirse al receptor de transferrina con la misma velocidad de disociación. En determinadas realizaciones, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 24. En determinadas realizaciones, las sustituciones,

inserciones, o eliminaciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-receptor de transferrina comprende la secuencia VH de SEQ ID NO: 24, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una realización particular, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-receptor de transferrina, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90%, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y que tiene aproximadamente la misma velocidad de disociación que un anticuerpo que comprende la secuencia de dominio variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 37. En determinadas realizaciones, una secuencia VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones, o eliminaciones en relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende esa secuencia retiene la capacidad para unirse al receptor de transferrina con la misma velocidad de disociación. En determinadas realizaciones, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 37. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-receptor de transferrina comprende la secuencia VL en la SEQ ID NO: 37, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una realización particular, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-receptor de transferrina, en donde el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y una VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 37, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccionales de aquellas secuencias.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-receptor de transferrina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-receptor de transferrina es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o $F(ab')_2$. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo de IgG1 intacto u otra clase de anticuerpo o isotipo tal como se define en el presente documento.

En una realización de todos los aspectos, el anticuerpo está acoplado a un compuesto terapéutico.

En otra realización de todos los aspectos, el anticuerpo está acoplado a un agente para la obtención de imágenes o a un marcador.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto terapéutico forma opcionalmente una porción del anticuerpo multiespecífico. En una realización similar, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a TfR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral. En dicho aspecto, el antígeno cerebral se selecciona entre el grupo que consiste en beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), tau, apolipoproteína E (ApoE), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 rica en repetición de leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma secretasa, receptor de muerte 6 (DR6), proteína precursora de amiloide (APP), receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), glucocerebrosidasa, y caspasa 6. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a alfa sinucleína. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a CD20. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a glucocerebrosidasa. En otra realización, el compuesto terapéutico es un fármaco para un trastorno neurológico.

En un aspecto de la realización anterior, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto de la realización anterior, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores para su uso como un medicamento.

En otro aspecto de la realización anterior, la invención proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos anteriores en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico. En una realización, el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno o enfermedad ocular, un trastorno comicial, un trastorno del almacenamiento lisosomal, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno de la conducta, e inflamación del SNC.

En otro aspecto de la realización anterior, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico. En una realización, el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno o enfermedad ocular, un trastorno comicial, un trastorno del almacenamiento lisosomal, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno de la conducta, e inflamación del SNC.

En otro aspecto de la realización anterior, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores para su uso en el transporte de uno o más compuestos a través de la BHE.

En otro aspecto de la realización anterior, se proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos anteriores en la fabricación de un medicamento para transportar uno o más compuestos a través de la BHE.

En un aspecto de la realización anterior, se proporciona un método para transportar compuestos a través de la BHE en un sujeto, que comprende exponer cualquiera de los anticuerpos anteriores a la BHE de tal forma que el anticuerpo transporta el compuesto acoplado al mismo a través de la BHE. En una realización, la BHE se encuentra en un sujeto humano. En una realización, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra a una dosis terapéutica. En una realización, la dosis terapéutica es saturante de TfR. En otra realización, la administración del anticuerpo es a una dosis y/o a una frecuencia de dosis calibrada para minimizar síntomas clínicos agudos de la administración del anticuerpo.

En otro aspecto de la realización anterior, se proporciona un método para aumentar la exposición del SNC de un sujeto a un compuesto, que comprende exponer cualquiera de los anticuerpos anteriores a la BHE de tal forma que el anticuerpo

transporta el compuesto acoplado al mismo a través de la BHE. En una realización, la BHE se encuentra en un sujeto humano. En una realización, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra a una dosis terapéutica. En una realización, la dosis terapéutica es saturante de TfR. En otra realización, la administración del anticuerpo es a una dosis y/o a una frecuencia de dosis calibrada para minimizar síntomas clínicos agudos de la administración del anticuerpo.

En un aspecto de la realización anterior, se proporciona un método para aumentar la retención en el SNC de un compuesto administrado a un sujeto, que comprende exponer cualquiera de los anticuerpos anteriores a la BHE de tal forma que aumenta la retención del compuesto en el SNC. En una realización, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra a una dosis terapéutica. En una realización, la dosis terapéutica es saturante de TfR. En otra realización, la administración del anticuerpo es a una dosis y/o a una frecuencia de dosis calibrada para minimizar síntomas clínicos agudos de la administración del anticuerpo.

En un aspecto de la realización anterior, se proporciona un método para tratar un trastorno neurológico en un mamífero, que comprende tratar al mamífero con cualquiera de los anticuerpos anteriores. En una realización, el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno o enfermedad ocular, un trastorno comicial, un trastorno del almacenamiento lisosomal, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno de la conducta, e inflamación del SNC. En una realización, el trastorno neurológico es en un sujeto humano. En una realización, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra a una dosis terapéutica. En una realización, la dosis terapéutica es saturante de TfR. En otra realización, la administración del anticuerpo es a una dosis y/o a una frecuencia de dosis calibrada para minimizar síntomas clínicos agudos de la administración del anticuerpo.

En una realización, el anticuerpo se modifica en una o más propiedades seleccionadas entre la función efectora de la región Fc del anticuerpo, la función de activación de complemento del anticuerpo, y la afinidad del anticuerpo para TfR.

En una realización, la propiedad es la función efectora de la región Fc del anticuerpo.

En una realización, la propiedad es la función de activación de complemento del anticuerpo.

En una realización, la propiedad es la afinidad del anticuerpo por TfR.

En una realización, la función efectora o la función de activación de complemento se ha reducido o eliminado en relación a un anticuerpo de tipo silvestre del mismo isotipo. En una realización, la función efectora se reduce o elimina mediante un método seleccionado entre reducción de la glucosilación del anticuerpo, modificación del isotipo del anticuerpo a un isotipo que de manera natural tiene función efectora reducida o eliminada, y modificación de la región Fc.

En una realización, la función efectora se reduce o elimina mediante la reducción de la glucosilación del anticuerpo. En una realización, se reduce la glucosilación del anticuerpo se reduce mediante un método seleccionado entre: producción del anticuerpo en un ambiente que no permite la glucosilación de tipo silvestre; eliminación de grupos carbohidrato ya presentes en el anticuerpo; y modificación del anticuerpo de tal forma que no tiene lugar la glucosilación de tipo silvestre.

En una realización, se reduce la glucosilación del anticuerpo se reduce mediante la producción del anticuerpo en un ambiente que no permite la glucosilación de tipo silvestre, tal como producción en un sistema de producción con células no de mamífero o donde el anticuerpo se produce de manera sintética. En una realización, el anticuerpo se produce en un sistema de producción en células no de mamífero. En otra realización, el anticuerpo se produce de manera sintética.

En una realización, la glucosilación del anticuerpo se reduce mediante modificación del anticuerpo, de tal forma que no tiene lugar la glucosilación de tipo silvestre del anticuerpo, tal como en donde la región Fc del anticuerpo comprende una mutación en la posición 297 de tal forma que el resto de asparagina de tipo silvestre en esa posición se reemplaza con otro aminoácido que interfiere con la glucosilación en esa posición.

En una realización, se reduce o elimina la función efectora mediante al menos una modificación de la región Fc. En una realización, se reduce o elimina la función efectora o la función de activación de complemento mediante la eliminación de la totalidad o parte de la región Fc, o modificando el anticuerpo de tal forma que no incluye una región Fc o una región Fc no competente para función efectora o función de activación de complemento. En una realización, la al menos una modificación de la región Fc se selecciona entre: una mutación puntual de la región Fc para impedir la unión a uno o más receptores de Fc seleccionada entre las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295,

296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 30, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, y 439; una mutación puntual de la región Fc para impedir la unión a C1q seleccionada entre las siguientes posiciones: 270, 322, 329, y 321; eliminar parte o la totalidad de la región Fc, y una mutación puntual en la posición 132 del dominio CH1. En una realización, la modificación es una mutación puntual de la región Fc para impedir la unión a C1q seleccionada entre las siguientes posiciones: 270, 322, 329, y 321. En otra realización, la modificación es la eliminación de parte o la totalidad de la región Fc. En otra realización, la función desencadenante de complemento se reduce o elimina mediante la eliminación de la totalidad o parte de la región Fc, o modificando el anticuerpo de tal forma que no incluye una región Fc que se acopla a la ruta de complemento. En una realización, el anticuerpo se selecciona entre un Fab o un anticuerpo monocatenario. En otra realización, la región no Fc del anticuerpo se modifica para reducir o eliminar la activación de la ruta de complemento por el anticuerpo. En una realización, la modificación es una mutación puntual de la región CH1 para impedir la unión a C3. En una realización, la mutación es en la posición 132 (véase, por ejemplo, Vidarte et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 38217-38223).

En un aspecto de la realización anterior, se reduce la afinidad del anticuerpo por TfR, según se mide en relación a un anticuerpo de tipo silvestre del mismo isotipo que no tiene afinidad reducida por TfR. En dicho aspecto, el anticuerpo tiene una $K_D$ o $CI_{50}$ por TfR de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 μM.

En una realización, el anticuerpo tal como se comunica en el presente documento es silente para función efectora. En una realización, el anticuerpo no tiene función efectora. En una realización, el anticuerpo es de subclase IgG1 humana y tiene las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una realización, el anticuerpo es

a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG1 humana, o
b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG4 humana, o
a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G,
d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y opcionalmente P329G,
e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones

T366S, L368A, Y407V y Y349C en la otra cadena pesada respectiva, o

f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P y opcionalmente P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V y Y349C en la otra cadena pesada respectiva.

En un aspecto de la realización anterior, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto de la realización anterior, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores para su uso como un medicamento.

En otro aspecto de la realización anterior, la invención proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos anteriores en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico. En una realización, el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno o enfermedad ocular, un trastorno comicial, un trastorno del almacenamiento lisosomal, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno de la conducta, e inflamación del SNC.

En otro aspecto de la realización anterior, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico. En una realización, el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno o enfermedad ocular, un trastorno comicial, un trastorno del almacenamiento lisosomal, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno de la conducta, e inflamación del SNC.

En otro aspecto de la realización anterior, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores para su uso en el transporte de uno o más compuestos a través de la BHE.

En otro aspecto de la realización anterior, se proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos anteriores en la fabricación de un medicamento para transportar uno o más compuestos a través de la BHE.

En un aspecto de la realización anterior, se proporciona un método para transportar compuestos a través de la BHE en un sujeto, que comprende exponer cualquiera de los anticuerpos anteriores a la BHE de tal forma que el anticuerpo transporta el

compuesto acoplado al mismo a través de la BHE. En una realización, la BHE se encuentra en un sujeto humano. En una realización, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra a una dosis terapéutica. En una realización, la dosis terapéutica es saturante de TfR. En otra realización, la administración del anticuerpo es a una dosis y/o a una frecuencia de dosis calibrada para minimizar síntomas clínicos agudos de la administración del anticuerpo.

En otro aspecto de la realización anterior, se proporciona un método para aumentar la exposición del SNC de un sujeto a un compuesto, que comprende exponer cualquiera de los anticuerpos anteriores a la BHE de tal forma que el anticuerpo transporta el compuesto acoplado al mismo a través de la BHE. En una realización, la BHE se encuentra en un sujeto humano. En una realización, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra a una dosis terapéutica. En una realización, la dosis terapéutica es saturante de TfR. En otra realización, la administración del anticuerpo es a una dosis y/o a una frecuencia de dosis calibrada para minimizar síntomas clínicos agudos de la administración del anticuerpo.

En un aspecto de la realización anterior, se proporciona un método para aumentar la retención en el SNC de un compuesto administrado a un sujeto, que comprende exponer cualquiera de los anticuerpos anteriores a la BHE de tal forma que aumenta la retención del compuesto en el SNC. En una realización, la BHE se encuentra en un sujeto humano. En una realización, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra a una dosis terapéutica. En una realización, la dosis terapéutica es saturante de TfR. En otra realización, la administración del anticuerpo es a una dosis y/o a una frecuencia de dosis calibrada para minimizar síntomas clínicos agudos de la administración del anticuerpo.

En un aspecto de la realización anterior, se proporciona un método para tratar un trastorno neurológico en un mamífero, que comprende tratar al mamífero con cualquiera de los anticuerpos anteriores. En una realización, el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno o enfermedad ocular, un trastorno comicial, un trastorno del almacenamiento lisosomal, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno de la conducta, e inflamación del SNC. En otro aspecto relacionado, el trastorno neurológico es en un sujeto humano. En una realización, el anticuerpo acoplado al compuesto se administra a una dosis terapéutica. En una realización, la dosis terapéutica es saturante de TfR. En otra realización, la administración del anticuerpo es a una dosis y/o a una frecuencia de dosis calibrada para minimizar síntomas clínicos agudos de la

administración del anticuerpo.

En otra realización, se proporciona un método para reducir la eliminación de un compuesto administrado a un sujeto, en donde el compuesto se acopla a un anticuerpo que se une al TfR con baja afinidad, de tal forma que se reduce la eliminación del compuesto.

En otra realización, se proporciona un método para optimizar la farmacocinética y/o farmacodinámica de un compuesto para que sea eficaz en el SNC en un sujeto, en donde el compuesto se acopla a un anticuerpo que se une al TfR con baja afinidad, y el anticuerpo se selecciona de tal forma que su afinidad por TfR después de acoplarse al compuesto da como resultado una cantidad de transporte del anticuerpo conjugado al compuesto a través de la BHE que optimiza la farmacocinética y/o la farmacodinámica del compuesto en el SNC.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-receptor de transferrina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores puede incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, tal como se describen en las Secciones 1-5 a continuación:

**1. Afinidad de anticuerpo**

En una realización, la Kd se mide mediante un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA). En una realización, se lleva a cabo un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión en solución de los Fab por su antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con $^{125}$I en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, y a continuación capturar el antígeno unido con una placa revestida de anticuerpo contra Fab (véase, por ejemplo, Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren durante toda una noche placas multipocillo MICROTITER® (Thermo Scientific) con 5 µg/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 ℃). En una placa no adsorbente (Nunc Nº 269620) , se mezclan 100 pM o 26 pM de [$^{125}$I]-antígeno con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta, L.G. et al., Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599). El Fab de interés se incuba entonces durante toda una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más

largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurarse de que se alcanza el equilibrio. A partir de ahí, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Entonces se retira la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 al 0,1 % (TWEEN-20®) en PBS. Cuando se secan las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleante (MICROSCINT-20 ™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan una unión menor o igual al 20 % de la máxima se seleccionan para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, Kd se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE®. Por ejemplo, un ensayo usando un dispositivo BIACORE®-2000 o un BIACORE ®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se lleva a cabo a 25 ℃ con antígeno inmovilizado en microplac as CM5 a ~10 unidades de respuesta (UR). En una realización, se activan microplacas de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~ 0.2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para las medidas cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo de polisorbato 20 (TWEEN-20™) al 0,05 % (PBST) a 25 ℃ a un caudal de aproximad amente 25 µl/min. Las velocidades de asociación ($k_{on}$) y velocidades de disociación ($k_{off}$) se calculan usando un modelo simple de unión Langmuir uno a uno (programa de evaluación BIACORE® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (KD) se calcula como la proporción $k_{off}/k_{on}$ (véase, por ejemplo, Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Si la velocidad de asociación sobrepasa los $10^6$ $M^{-1}$ $s^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, puede determinarse la velocidad de asociación usando una técnica de inactivación fluorescente que mida el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 ℃ de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ 8000-series (ThermoSpectronic) con una cubeta activada.

**2. Fragmentos de anticuerpo**

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore (eds.), Springer-Verlag, Nueva York (1994), págs. 269-315; véase también el documento WO 93/16185; US 5.571.894 y US 5.587.458. Para la discusión de fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que comprenden restos de epítopo de unión a receptor salvajes y que tienen semivida in vivo aumentada, véase el documento US 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 404 097; el documento WO 1993/01161; Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (20039 129-134).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, el documento US 6.248.516).

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante varias técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción mediante células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), tal como se describe en el presente documento.

**3. Anticuerpos quiméricos y humanizados**

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en el documento US 4.816.567; y Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región

variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "de clase cambiada" en el que la clase o subclase se ha cambiado respecto del anticuerpo parental. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad a humanos, mientras que mantienen la especificidad y afinidad del anticuerpo parental no humano. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpo humanas. Un anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los restos HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y métodos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633, y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann, I. et al., Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; los documentos US 5.821.337, US 7.527.791, US 6.982.321, y US 7.087.409; Kashmiri, S.V. et al., Methods 36 (2005) 25-34 (que describe el injerto de región determinante de especificidad (SDR)); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (que describe la “reformación de superficies”); Dall’Acqua, W.F. et al., Methods 36 (2005) 43-60 (que describe el “reordenamiento de FR”); y Osbourn, J. et al., Methods 36 (2005) 61-68 y Klimka, A. et al., Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260 (que describe el enfoque de “selección guiada” para el reordenamiento de FR).

Las regiones marco conservadas humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, pero sin limitación a: regiones marco conservadas seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308; regiones marco conservadas procedentes de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Presta, L.G. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632); regiones marco conservadas maduras humanas (mutadas somáticamente) o

regiones marco conservadas de línea germinal (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633); y regiones marco conservadas derivadas de la exploración de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca, M. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684 y Rosok, M.J. et al., J. Biol. Chem. 271 (19969 22611-22618).

**4. Anticuerpos multiespecíficos**

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En determinadas realizaciones, una de las especificidades es por el receptor de transferrina y la otra es por cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos a células que expresan el receptor de transferrina. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, expresión conjunta recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein, C. y Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, documento WO 93/08829, y Traunecker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659), y diseño de “pomo en agujero” (véase, por ejemplo, el documento US 5.731.168). Los anticuerpos biespecíficos también pueden prepararse diseñando efectos directores electrostáticos para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, el documento US 4.676.980, y Brennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553; usando tecnología de "diacuerpo" para producir fragmentos de anticuerpo biespecíficos (véase, por ejemplo, Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448); y usando dímeros de Fv monocatenarios (scFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374); y preparando anticuerpos triespecíficos tal como se describe, por ejemplo, en Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69).

Los anticuerpos diseñados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo "anticuerpos Octopus", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

El anticuerpo o fragmento ene l presente documento incluye también un “Fab de acción dual” o “DAF” que comprende un sitio de unión a antígeno que se une al receptor de transferrina así como a otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792, y WO 2010/145793.

En una realización de todos los aspectos tal como se han comunicado en el presente documento el anticuerpo anti-receptor de transferrina es un anticuerpo biespecífico.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo biespecífico bivalente que comprende

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, en donde los dominios variables VL y VH de la segunda cadena ligera y de la segunda cadena pesada están intercambiados entre sí,

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

El anticuerpo según a) no contiene una modificación como la comunicada en b) y la cadena pesada y la cadena ligera según a) son cadenas aisladas.

En el anticuerpo según b)

en la cadena ligera

el dominio variable de cadena ligera VL se reemplaza por el dominio variable de cadena pesada VH de dicho anticuerpo,

y

en la cadena pesada

el dominio variable de cadena pesada VH se reemplaza por el dominio

variable de cadena ligera VL de dicho anticuerpo.

En una realización

i) en el dominio constante CL de la primera cadena ligera según a) el aminoácido en la posición 124 (numeración según Kabat) se sustituye por un aminoácido cargado positivamente, y en donde en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada según a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 (numeración según el índice EU de Kabat) se sustituye por un aminoácido cargado negativamente,

o

ii) en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera según b) el aminoácido en la posición 124 (numeración según Kabat) se sustituye por un aminoácido cargado positivamente, y en donde en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada según b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 (numeración según el índice EU de Kabat) se sustituye por un aminoácido cargado negativamente.

En una realización preferida

i) en el dominio constante CL de la primera cadena ligera según a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferida independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada según a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat),

o

ii) en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera según b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización preferida independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada según b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición

213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización, en el domino constante CL de la segunda cadena pesada, los aminoácidos en la posición 124 y 123 se sustituyen por K (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización, en el domino constante CH1 de la segunda cadena ligera, los aminoácidos en la posición 147 y 213 se sustituyen por E (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización preferida, en el dominio constante CL de la primera cadena ligera los aminoácidos en la posición 124 y 123 se sustituyen por K, y en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada, los aminoácidos en la posición 147 y 213 se sustituyen por E (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización, en el dominio constante CL de la segunda cadena pesada, los aminoácidos en la posición 124 y 123 se sustituyen por K, y en donde en el dominio constante CH1 de la segunda cadena ligera, los aminoácidos en la posición 147 y 213 se sustituyen por E, y en el dominio variable VL de la primera cadena ligera, el aminoácido en la posición 38 está sustituido por K, en el dominio variable VH de la primera cadena pesada el aminoácido en la posición 39 está sustituido por E, en el dominio variable VL de la segunda cadena pesada el aminoácido en la posición 38 está sustituido por K, y en el dominio variable VH de la segunda cadena ligera el aminoácido en la posición 39 está sustituido por E (numeración según el índice EU de Kabat).

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo biespecífico bivalente que comprende

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, en donde los dominios variables VL y VH de la segunda cadena ligera y de la segunda cadena pesada están intercambiados entre sí, y en donde los dominios constantes CL y CH1 de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada están intercambiados entre sí,

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de

transferrina humano.

El anticuerpo según a) no contiene una modificación como la comunicada en b) y la cadena pesada y la cadena ligera según a) son cadenas aisladas.

En el anticuerpo según b)

en la cadena ligera

el dominio variable de cadena ligera VL se reemplaza por el dominio variable de cadena pesada VH de dicho anticuerpo, y el dominio constante de cadena ligera CL está reemplazado por el dominio constante de cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo;

y

en la cadena pesada

el dominio variable de cadena pesada VH se reemplaza por el dominio variable de cadena ligera VL de dicho anticuerpo, y el dominio constante de cadena pesada CH1 se reemplaza por el dominio constante de cadena ligera CL de dicho anticuerpo.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo biespecífico bivalente que comprende

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, en donde los dominios constantes CL y CH1 de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada están intercambiados entre sí,

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

El anticuerpo según a) no contiene una modificación como la comunicada en b) y la cadena pesada y la cadena ligera según a) son cadenas aisladas.

En el anticuerpo según b)

en la cadena ligera

el dominio constante de cadena ligera CL está reemplazado por el dominio constante de cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo;

y en la cadena pesada

el dominio constante de cadena pesada CH1 se reemplaza por el dominio constante de cadena ligera CL de dicho anticuerpo.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo multiespecífico que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo, y

b) uno, dos, tres o cuatro fragmentos Fab monocatenarios que se unen específicamente a de uno a cuatro antígenos adicionales (es decir, un segundo y/o un tercer y/o un cuarto y/o quinto antígeno, uniéndose preferentemente de manera específica a un antígeno adicional, es decir, un segundo antígeno),

en donde dichos fragmentos Fab monocatenarios según b) están fusionados a dicho anticuerpo de longitud completa según a) a través de un enlazador peptídico en el extremo C o N-terminal de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo de longitud completa,

en donde el primer antígeno o uno de los antígenos adicionales es el receptor de transferrina humano.

En una realización, uno o dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo de longitud completa a través de un enlazador peptídico en el extremo C-terminal de las cadenas ligeras o pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa.

En una realización, uno o dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo de longitud completa a través de un enlazador peptídico en el extremo C-terminal de las cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa.

En una realización, uno o dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo de longitud

completa a través de un enlazador peptídico en el extremo C-terminal de las cadenas ligeras de dicho anticuerpo de longitud completa.

En una realización, dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo de longitud completa a través de un enlazador peptídico en el extremo C-terminal de cada cadena ligera o pesada de dicho anticuerpo de longitud completa.

En una realización, dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo de longitud completa a través de un enlazador peptídico en el extremo C-terminal de cada cadena pesada de dicho anticuerpo de longitud completa.

En una realización, dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo de longitud completa a través de un enlazador peptídico en el extremo C-terminal de cada cadena ligera de dicho anticuerpo de longitud completa.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo biespecífico trivalente que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo,

b) un primer polipéptido que consiste en
   - ba) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo,

     o
   - bb) un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo,

   en donde dicho primer polipéptido está fusionado con el extremo N-terminal de su dominio VH a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal de una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,

c) un segundo polipéptido que consiste en
   - ca) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo,

     o
   - cb) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo,

en donde dicho segundo polipéptido está fusionado con el extremo N-terminal del dominio VL a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal de la otra de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,

y

en donde el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo del primer polipéptido y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo del segundo polipéptido juntos forman un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno,

y

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

En una realización, el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo del polipéptido según b) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo del polipéptido según c) están unidos y estabilizados a través de un puente disulfuro intercadena mediante la introducción de un enlace disulfuro entre las siguientes posiciones:

i) la posición 44 del dominio variable de cadena pesada a la posición 100 del dominio variable de cadena ligera, o
ii) la posición 105 del dominio variable de cadena pesada a la posición 43 del dominio variable de cadena ligera, o
iii) la posición 101 del dominio variable de cadena pesada a la posición 100 del dominio variable de cadena ligera (numeración siempre según el índice EU de Kabat).

Las técnicas para introducir puentes disulfuro no naturales para estabilizar se describen, por ejemplo, en el documento WO 94/029350, Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393; o Schmidt, M., et al., Oncogene (1999) 18 1711-1721. En una realización, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los polipéptidos según b) y c) es entre la posición 44 del dominio variable de cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de cadena ligera. En una realización, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los polipéptidos según b) y c) es entre la posición 105 del dominio variable de cadena pesada y la posición 43 del dominio variable de cadena ligera (numeración siempre de acuerdo con Kabat).

En una realización, se prefiere un anticuerpo biespecífico trivalente sin dicha estabilización opcional con disulfuro entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab monocatenarios.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo triespecífico o tetraespecífico, que comprende

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno, y

b) una segunda cadena ligera (modificada) y una segunda cadena pesada (modificada) de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en donde los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí, y/o en donde los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí, y

c) en donde de uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen a uno o dos antígenos adicionales (es decir, a un tercer y/o cuarto antígeno) se fusionan a través de un enlazador peptídico al extremo C o N-terminal de las cadenas pesadas o a las cadenas pesadas de a) y/o b),

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno o uno de los antígenos adicionales es el receptor de transferrina humano.

El anticuerpo según a) no contiene una modificación como la comunicada en b) y la cadena pesada y la cadena ligera según a) son cadenas aisladas.

En una realización, el anticuerpo triespecífico o tetraespecífico comprende según c) uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales.

En una realización, los péptidos de unión a antígeno se seleccionan entre el grupo de un fragmento scFv y un fragmento scFab.

En una realización, los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFv.

En una realización, los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFab.

En una realización, los péptidos de unión a antígeno están unidos al extremo C-terminal de las cadenas pesadas de a) y/o b).

En una realización, el anticuerpo triespecífico o tetraespecífico comprende según c)

uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno adicional.

En una realización, el anticuerpo triespecífico o tetraespecífico comprende según c) dos péptidos de unión a antígeno idénticos que se unen específicamente a un tercer antígeno. En una realización preferida, dichos dos péptidos de unión a antígeno idénticos están ambos fusionados a través del mismo enlazador peptídico al extremo C-terminal de las cadenas pesadas de a) y b). En una realización preferida, los dos péptidos de unión a antígeno idénticos son bien un fragmento scFv o un fragmento scFab.

En una realización, el anticuerpo triespecífico o tetraespecífico comprende según c) dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a un tercer y a un cuarto antígeno. En una realización, dichos dos péptidos de unión a antígeno están ambos fusionados a través del mismo conector peptídico al extremo C-terminal de las cadenas pesadas de a) y b). En una realización preferida, dichos dos péptidos de unión a antígeno son bien un fragmento scFv o un fragmento scFab.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo biespecífico tetravalente que comprende

a) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de un anticuerpo, que se unen específicamente a un primer antígeno (y comprenden dos fragmentos Fab),

b) dos fragmentos Fab adicionales de un anticuerpo, que se unen específicamente a un segundo antígeno, en donde dichos fragmentos Fab adicionales están ambos fusionados a través de un enlazador peptídico a los extremos C o N-terminales de las cadenas pesadas de a),

y

en donde se efectuaron las siguientes modificaciones en los fragmentos Fab

i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí, y/o los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí,

o

ii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí, y los dominios constantes CL y CH1 se

intercambian entre sí,

y

en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí, o los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí,

o

iii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí, o los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí,

y

en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí, y los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí,

o

iv) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí,

o

v) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí,

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

En una realización, dichos fragmentos Fab adicionales están ambos fusionados a través de un enlazador peptídico bien a los extremos C-terminales de las cadenas pesadas de a), o a los extremos N-terminales de las cadenas pesadas de a).

En una realización, dichos fragmentos Fab adicionales están ambos fusionados a través de un enlazador peptídico bien a los extremos C-terminales de las cadenas pesadas de a).

En una realización, dichos fragmentos Fab adicionales están ambos fusionados a través de un conector peptídico a los extremos N-terminales de las cadenas pesadas de a).

En una realización, se efectúan las siguientes modificaciones en los fragmentos Fab:

i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí,
y/o
los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí.

En una realización, se efectúan las siguientes modificaciones en los fragmentos Fab:

i) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí,
y/o
los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí.

En una realización, se efectúan las siguientes modificaciones en los fragmentos Fab:

i) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí.

En una realización, se efectúan las siguientes modificaciones en los fragmentos Fab:

i) en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se intercambian entre sí,
y/o
los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí.

En una realización, se efectúan las siguientes modificaciones en los fragmentos Fab:

i) en ambos fragmentos Fab de b) los dominios constantes CL y CH1 se intercambian entre sí.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo biespecífico tetravalente que comprende:

a) una cadena pesada (modificada) de un primer anticuerpo, que se une específicamente a un primer antígeno y comprende un primer par de dominio VH-CH1, en donde se fusiona al extremo C-terminal de dicha cadena pesada el extremo N-terminal de un segundo par de dominio VH-CH1 de

dicho primer anticuerpo a través de un enlazador peptídico,

b) dos cadenas ligeras de dicho primer anticuerpo de a),

c) una cadena pesada (modificada) de un segundo anticuerpo, que se une específicamente a un segundo antígeno y comprende un primer par de dominio VH-CL, en donde se fusiona al extremo C-terminal de dicha cadena pesada el extremo N-terminal de un segundo par de dominio VH-CL de dicho segundo anticuerpo a través de un enlazador peptídico, y

d) dos cadenas ligeras (modificadas) de dicho segundo anticuerpo de c), comprendiendo cada una un par de dominio de CL-CH1,

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo biespecífico que comprende

a) la cadena pesada y la cadena ligera de un primer anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno, y

b) la cadena pesada y la cadena ligera de un segundo anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en donde el extremo N-terminal de la cadena pesada está conectado al extremo C-terminal de la cadena ligera a través de un enlazador peptídico,

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

El anticuerpo según a) no contiene una modificación como la comunicada en b) y la cadena pesada y la cadena ligera son cadenas aisladas.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo biespecífico que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo, y

b) un fragmento Fv que se une específicamente a un segundo antígeno que comprende un dominio $VH^2$ y un dominio $VL^2$, en donde ambos dominios

están conectados entre sí a través de un puente disulfuro,

en donde únicamente bien el dominio $VH^2$ o bien el domino $VL^2$ está fusionado a través de un enlazador peptídico a la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno,

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

En el biespecífico, las cadenas pesadas y las cadenas ligeras según a) son cadenas aisladas.

En una realización, el otro del dominio $VH^2$ o $VL^2$ no está fusionado a través de un enlazador peptídico a la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno.

En todos los aspectos, tal como se comunican en el presente documento, la primera cadena ligera comprende un dominio VL y un dominio CL y la primera cadena pesada comprende un dominio VH, un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo trivalente biespecífico que comprende

a) dos fragmentos Fab que se unen específicamente a un primer antígeno,

b) un fragmento CrossFab que se une específicamente a un segundo antígeno en el que los dominios CH1 y CL están intercambiados entre sí,

c) una región Fc que comprende una primera cadena pesada de región-Fc y una segunda cadena pesada de región Fc,

en donde el extremo C-terminal de los dominios CH1 de los dos fragmentos Fab están conectados al extremo N-terminal de los polipéptidos de región Fc de cadena pesada, y

en donde el extremo C-terminal del dominio CL del fragmento CrossFab está conectado al extremo N-terminal del dominio VH de uno de los fragmentos Fab, y

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

Un aspecto tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo trivalente biespecífico que comprende

a) dos fragmentos Fab que se unen específicamente a un primer antígeno,

b) un fragmento CrossFab que se une específicamente a un segundo antígeno en el que los dominios CH1 y CL están intercambiados entre sí,

c) una región Fc que comprende una primera cadena pesada de región-Fc y una segunda cadena pesada de región Fc,

en donde el extremo C-terminal del dominio CH1 del primer fragmento Fab está conectado al extremo N-terminal de los polipéptidos de región Fc de cadena pesada y el extremo C-terminal del dominio CL del fragmento CrossFab está conectado al extremo N-terminal del otro polipéptido de región Fc de cadena pesada, y

en donde el extremo C-terminal del dominio CH1 del segundo fragmento Fab está conectado al extremo N-terminal del dominio VH del primer fragmento Fab o al extremo N-terminal del dominio VH del fragmento CrossFab, y

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo biespecífico que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo, y

b) un fragmento Fab que se une específicamente a un segundo antígeno que comprende un dominio $VH^2$ y un dominio $VL^2$ que comprende un fragmento de cadena pesada y un fragmento de cadena ligera, en donde

en el fragmento de cadena ligera

el dominio variable de cadena ligera $VL^2$ se reemplaza por el dominio variable de cadena pesada $VH^2$ de dicho anticuerpo,

y

en el fragmento de cadena pesada

el dominio variable de cadena pesada $VH^2$ se reemplaza por el dominio variable de cadena ligera $VL^2$ de dicho anticuerpo

en donde el fragmento Fab de cadena pesada se inserta entre el dominio CH1 de una de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa y la región Fc respectiva del anticuerpo de longitud completa, y el extremo N-terminal del fragmento Fab de cadena ligera está conjugado al extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa que está emparejado con la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa en el que se ha insertado el fragmento Fab de cadena pesada, y

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

Un aspecto, tal como se comunica en el presente documento, es un anticuerpo biespecífico que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo, y

b) un fragmento Fab que se une específicamente a un segundo antígeno que comprende un dominio $VH^2$ y un dominio $VL^2$ que comprende un fragmento de cadena pesada y un fragmento de cadena ligera, en donde

en el fragmento de cadena ligera

el dominio variable de cadena ligera $VL^2$ se reemplaza por el dominio variable de cadena pesada $VH^2$ de dicho anticuerpo,

y

en el fragmento de cadena pesada

el dominio variable de cadena pesada $VH^2$ se reemplaza por el dominio variable de cadena ligera $VL^2$ de dicho anticuerpo

en donde el extremo C-terminal del fragmento de cadena pesada del fragmento Fab está conjugado al extremo N-terminal de una de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa y el extremo C-terminal del fragmento de cadena ligera del fragmento Fab está conjugado al extremo N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa que se empareja con la

cadena pesada del anticuerpo de longitud completa al que se conjuga el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab, y

en donde el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

En una realización de todos los aspectos, el anticuerpo tal como se comunica en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, que requiere de la heterodimerización de al menos dos polipéptidos de cadena pesada, y en donde el anticuerpo se une específicamente al receptor de transferrina humano y a un segundo antígeno no de receptor de transferrina humano.

Se han descrito varias estrategias de modificaciones de CH3 para que soporte la heterodimerización, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545; WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291, que se incluyen en el presente documento por referencia. Típicamente, en las estrategias conocidas en la técnica, el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada están ambos modificados por ingeniería genética de manera complementaria de tal forma que la cadena pesada que comprende un dominio CH3 modificado por ingeniería genética ya no puede heterodimerizar con otra cadena pesada de la misma estructura (por ejemplo, una primera cadena pesada con CH3 modificado por ingeniería genética ya no puede homodimerizar con otra primera cadena pesada con CH3 modificado por ingeniería genética; y una segunda cadena pesada con CH3 modificado por ingeniería genética ya no puede homodimerizar con otra cadena pesada con CH3 modificado por ingeniería genética). Por lo tanto, se fuerza a que la cadena pesada que comprende un dominio CH3 modificado por ingeniería genética homodimerice con otra cadena pesada que comprende el dominio CH3, que está modificado por ingeniería genética de una manera complementaria. Para esta realización de la invención, el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada están modificados por ingeniería genética de manera complementaria mediante sustituciones de aminoácidos, de tal forma que se fuerza a que la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada homodimericen, mientras que la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada ya no pueden homodimerizar (por ejemplo, por motivos estéricos).

Las diferentes estrategias conocidas en la técnica para soportar la heterodimerización de la cadena pesada, que se citaron e incluyeron anteriormente,

se contemplan como diferentes alternativas usadas en un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que comprende una "región Fab no cruzada" procedente de un primer anticuerpo, que se une específicamente a un primer antígeno, y una "región Fab cruzada" procedente de un segundo anticuerpo, que se une específicamente a un segundo antígeno, en combinación con las sustituciones de aminoácidos particulares descritas anteriormente para la invención.

Los dominios CH3 del anticuerpo multiespecífico, tal como se comunica en el presente documento, pueden alterarse mediante la tecnología de "pomos en agujeros" que se describe en detalle con varios ejemplos en, por ejemplo, el documento WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681. En este método, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para aumentar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "pomo", mientras que el otro es el "agujero". La introducción de un puente disulfuro estabiliza adicionalmente a los heterodímeros (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) y aumenta el rendimiento.

En una realización preferida, el anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de pomos" y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la cadena "de agujero" (numeración según el índice EU de Kabat). También puede usarse un puente disulfuro adicional intercadena entre los dominios CH3 (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681) por ejemplo, mediante la introducción de una mutación Y349C en el dominio CH3 de la "cadena de agujeros" y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la "cadena de pomo". Por lo tanto, en otra realización preferida, el anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones E356C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 o el anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (formando la mutación adicional Y349C en un dominio CH3 y la mutación adicional E356C o S354C en el otro dominio CH3 un puente disulfuro intercadena) (numeración según el índice EU de Kabat).

Pero otras tecnologías de pomos en agujeros, tal como se describen en el documento EP 1 870 459A1, puede usarse como alternativa o adicionalmente. En una realización, el anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento comprende las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de pomos" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de agujero" (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización, el anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de pomos" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de agujero" y adicionalmente las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de pomos" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de agujero" (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización, el anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o el anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y adicionalmente las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de pomos" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de agujero" (numeración según el índice EU de Kabat).

Aparte de la "tecnología de pomos en agujeros", se conocen en la materia otras técnicas para modificar los dominios CH3 de las cadenas pesadas de un anticuerpo multiespecífico para forzar la heterodimerización. Estas tecnologías, especialmente aquellas descritas en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 y WO 2013/096291 se contemplan en el presente documento como alternativas a la "tecnología de pomos en agujeros" en combinación con un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento.

En una realización de un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, se usa la estrategia descrita en el documento EP 1870459 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y de la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. Esta estrategia se basa en la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de

aminoácidos específicas en la interfaz de dominio CH3/CH3 entre ambas de la primera y la segunda cadena pesada.

Por consiguiente, esta realización se refiere a un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, en donde en la estructura terciaria del anticuerpo, el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada forman una interfaz que se sitúa entre los dominios CH3 de anticuerpo respectivos, en donde las respectivas secuencias de aminoácidos del dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada comprenden cada una un conjunto de aminoácidos que se sitúa entre dicha interfaz en la estructura terciaria del anticuerpo, en donde desde el conjunto de aminoácidos que se sitúa en la interfaz en el dominio CH3 de una cadena pesada, se sustituye un primer aminoácido por un aminoácido cargado positivamente y desde el conjunto de aminoácidos que se sitúa en la interfaz en el dominio CH3 de la otra cadena pesada se sustituye un segundo aminoácido con un aminoácido cargado negativamente. El anticuerpo multiespecífico según esta realización se cita también en el presente documento como anticuerpo multiespecífico con CH3(+/-) modificado por ingeniería genética" (en donde la abreviatura (+/-) se refiere a los aminoácidos de carga opuesta que se introdujeron en los dominios CH3 respectivos).

En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3(+/-) modificado por ingeniería genética, tal como se comunica en el presente documento, el aminoácido cargado positivamente se selecciona entre K, R y H, y el aminoácido cargado negativamente se selecciona entre E o D.

En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3(+/-) modificado por ingeniería genética, tal como se comunica en el presente documento, el aminoácido cargado positivamente se selecciona entre K y R, y el aminoácido cargado negativamente se selecciona entre E o D.

En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3(+/-) modificado por ingeniería genética, tal como se comunica en el presente documento, el aminoácido cargado positivamente es K, y el aminoácido cargado negativamente es E.

En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3(+/-) modificado por ingeniería genética, tal como se comunica en el presente documento, el aminoácido R en la posición 409 en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye por D y el aminoácido K en la otra posición se sustituye por E, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada el aminoácido D en la posición 399 se sustituye por K y el

aminoácido E en la posición 357 se sustituye por K (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización de un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, se usa la estrategia descrita en el documento WO 2013/157953 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y de la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido T en la posición 366 por K, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, se sustituye el aminoácido L en la posición 351 por D (numeración según el índice EU de Kabat). En otra realización de dicho anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido T en la posición 366 por K y se sustituye el aminoácido L en la posición 351 por K, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, se sustituye el aminoácido L en la posición 351 por D (numeración según el índice EU de Kabat).

En otra realización de dicho anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido T en la posición 366 por K y se sustituye el aminoácido L en la posición 351 por K, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, se sustituye el aminoácido L en la posición 351 por D (numeración según el índice EU de Kabat). Además, al menos una de las siguientes sustituciones está comprendida en el domino CH3 de la otra cadena pesada: el aminoácido Y en la posición 349 se sustituye por E, el aminoácido Y en la posición 349 se sustituye por D y el aminoácido L en la posición 368 se sustituye por E (numeración según el índice EU de Kabat). En una realización, se sustituye el aminoácido L en la posición 368 por E (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización de un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, se usa la estrategia descrita en el documento WO 2012/058768 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y de la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido L en la posición 351 por Y y se sustituye el aminoácido Y en la posición 407 por A, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por A y el aminoácido K en la posición 409 se sustituye por F (numeración según el índice EU de Kabat). En otra realización, además de las sustituciones

anteriormente mencionadas, en el dominio CH3 de la otra cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 411 (T en origen), 399 (D en origen), 400 (S en origen), 405 (F en origen), 390 (N en origen) y 392 (K en origen) se sustituye (numeración según el índice EU de Kabat). Las sustituciones preferidas son:

- sustitución del aminoácido T en la posición 411 por un aminoácido seleccionado entre N, R, Q, K, D, E y W (numeración según el índice EU de Kabat),
- sustitución del aminoácido D en la posición 399 por un aminoácido seleccionado entre R, W, Y, y K (numeración según el índice EU de Kabat),
- sustitución del aminoácido S en la posición 400 por un aminoácido seleccionado entre E, D, R y K (numeración según el índice EU de Kabat),
- sustitución del aminoácido F en la posición 405 por un aminoácido seleccionado entre I, M, T, S, V y W (numeración según el índice EU de Kabat);
- sustitución del aminoácido N en la posición 390 por un aminoácido seleccionado entre R, K y D (numeración según el índice EU de Kabat); y
- sustitución del aminoácido K en la posición 392 por un aminoácido seleccionado entre V, M, R, L, F y E (numeración según el índice EU de Kabat).

En otra realización de dicho anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento (modificado por ingeniería genética según el documento WO 2012/058768), en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido L en la posición 351 por Y y se sustituye el aminoácido Y en la posición 407 por A, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por V y el aminoácido K en la posición 409 se sustituye por F (numeración según el índice EU de Kabat). En otra realización de dicho anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido Y en la posición 407 por A, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por A y el aminoácido K en la posición 409 se sustituye por F (numeración según el índice EU de Kabat). En dicha última realización anteriormente mencionada, en el dominio CH3 de dicha otra cadena pesada se sustituye el aminoácido K en la posición 392 por E, se sustituye el aminoácido T en la posición 411 por E, se sustituye el aminoácido Y en la posición 399 por R y se sustituye el aminoácido S en la posición 400 por R (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización de un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, se usa la estrategia descrita en el documento WO 2011/143545 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y de la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, se introducen modificaciones de aminoácidos en los dominios CH3 de ambas cadenas pesadas en las posiciones 368 y/o 409 (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización de un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, se usa la estrategia descrita en el documento WO 2011/090762 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y de la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. El documento WO 2011/090762 se refiere a modificaciones de aminoácidos según la tecnología de "pomos en agujeros". En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3(KiH) (CH3 con modificación de pomos en agujeros) modificado por ingeniería genética tal como se comunica en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido T en la posición 366 por W, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, se sustituye el aminoácido Y en la posición 407 por A (numeración según el índice EU de Kabat). En otra realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3(KiH) modificado por ingeniería genética tal como se comunica en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido T en la posición 366 por Y, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, se sustituye el aminoácido Y en la posición 407 por T (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización de un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, que es de isotipo IgG2, se usa la estrategia descrita en el documento WO 2011/090762 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y de la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico.

En una realización de un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, se usa la estrategia descrita en el documento WO 2009/089004 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y de la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido K o N en la posición 392 por un aminoácido cargado negativamente (en una realización preferida, por E o D, en una realización preferida por D), y en el dominio CH3 de la

otra cadena pesada se sustituye el aminoácido D en la posición 399, el aminoácido E o D en la posición 356 o el aminoácido E en la posición 357 por un aminoácido cargado positivamente (en una realización preferida, K o R, en una realización preferida por K, en una realización preferida se sustituyen los aminoácidos en las posiciones 399 o 356 por K) (numeración según el índice EU de Kabat). En una realización adicional, además de las sustituciones anteriormente mencionadas, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido K o R en la posición 409 por un aminoácido cargado negativamente (en una realización preferida, por E o D, en una realización preferida por D) (numeración según el índice EU de Kabat). En una realización adicional, además o como alternativa a las sustituciones anteriormente mencionadas, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituyen el aminoácido K en la posición 439 y/o el aminoácido K en la posición 370 de manera independiente del otro por un aminoácido cargado negativamente (en una realización preferida por E o D, en una realización preferida por D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización de un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, se usa la estrategia descrita en el documento WO 2007/147901 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y de la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En una realización de dicho anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada se sustituye el aminoácido K en la posición 253 por E, se sustituye el aminoácido D en la posición 282 por K y se sustituye el aminoácido K en la posición 322 por D, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada se sustituye el aminoácido D en la posición 239 por K, se sustituye el aminoácido E en la posición 240 por K y se sustituye el aminoácido K en la posición 292 por D (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización de un anticuerpo multiespecífico tal como se comunica en el presente documento, se usa la estrategia descrita en el documento WO 2007/110205 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y de la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico.

En una realización de todos los aspectos y realizaciones tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo triespecífico. En una realización preferida de la invención, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

En una realización de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo bivalente o trivalente. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo bivalente.

En una realización de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico tiene una estructura de dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG. En una realización adicional de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de subclase IgG1 humana, o de subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A. En una realización adicional de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de subclase IgG2 humana. En una realización adicional de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de subclase IgG3 humana. En una realización adicional de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de subclase IgG4 humana o de subclase IgG4 humana con la mutación S228P adicional. En una realización adicional de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de subclase IgG1 humana o de subclase IgG4 humana. En una realización adicional de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A (numeración según el índice EU de Kabat). En una realización adicional de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración según el índice EU de Kabat). En una realización adicional de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P y L235E (numeración según el índice EU de Kabat). En una realización adicional de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y P329G (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 tal como se ha especificado en el presente documento, comprende un dipéptido de glicina-lisina C-terminal adicional (G446 y K447, numeración según el índice EU de Kabat). En una realización de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, tal como se ha especificado en el presente documento, comprende un resto de glicina C-terminal adicional (G446, numeración según el índice EU de Kabat).

**5. Variantes de anticuerpo**

En determinadas realizaciones, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácido de un anticuerpo pueden prepararse introduciendo modificaciones adecuadas en la secuencia de nucleótidos que codifican al anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción, y sustitución se efectúa para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

**a) Variantes de sustitución, Variantes de sustitución y eliminación**

En determinadas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para mutagénesis sustitucional incluyen las HVR y las FR. En la tabla 1 se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezamiento de "sustituciones conservativas". En la tabla 1 se proporcionan más cambios sustanciales bajo el encabezamiento de "sustituciones ilustrativas", que se describen adicionalmente a continuación con referencia a las clases de cadena de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y explorarse los productos respecto de una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno mantenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

**TABLA 1**

| Resto Original | Sustituciones Ejemplares | Sustituciones conservativas |
|---|---|---|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile | Val |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn | Lys |
| Asn (N) | Gln; His; Asp, Lys; Arg | Gln |
| Asp (D) | Glu; Asn | Glu |
| Cys (C) | Ser; Ala | Ser |
| Gln (Q) | Asn; Glu | Asn |
| Glu (E) | Asp; Gln | Asp |
| Gly (G) | Ala | Ala |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg | Arg |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina | Leu |
| Leu (L) | Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn | Arg |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile | Leu |
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr | Tyr |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Val; Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser | Phe |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina | Leu |

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo a propiedades de cadena lateral común:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) restos que influencian la orientación de cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante (o variantes) resultante seleccionada para estudio posterior tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad aumentada, inmunogenicidad reducida) en relación al anticuerpo parental y/o tendrán determinadas propiedades biológicas sustancialmente mantenidas del anticuerpo parental. Una variante sustitucional ejemplar es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en presentación de fagos, tales como aquellas descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más restos de HVR y los anticuerpos variantes presentados en fagos y explorados para una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Pueden hacerse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones pueden hacerse en "puntos clave" de HVR, es decir, restos codificados por codones que sufren mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196), y/o restos que están en contacto con antígeno, evaluándose la VH o VL variante resultante para afinidad de unión. Se ha descrito la maduración por afinidad construyendo y reseleccionando a partir de bibliotecas secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R. et al. en Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37. En algunas realizaciones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para maduración mediante cualquiera de una variedad de métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, reordenamiento de cadenas, o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). Así se crea una biblioteca secundaria. Entonces se explora la biblioteca para identificar cualquier variante de anticuerpos con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que varios restos de HVR (por ejemplo, 4-6 restos a la vez) se aleatorizan. Los restos de HVR implicados en la unión a antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis de barrido de alanina o modelado. A menudo, CDR-H3 y CDR-L3 son la diana.

En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones pueden suceder dentro de una o más HVR siempre que dichas alteraciones no

reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden hacerse alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones conservativas tal como se proporciona en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden, por ejemplo, estar fuera de los restos en contacto con el antígeno en las HVR. En determinadas realizaciones de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR o bien está sin alterar, o contienen no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden usarse como diana para la mutagénesis se llama "mutagénesis de barrido de alanina", tal como se describe por Cunningham, B.C. y Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085. En este método, un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) se identifican y sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa, o adicionalmente, puede usarse una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos pueden usarse como diana o eliminarse como candidatos para sustitución. Las variantes pueden explorarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminal en el intervalo de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos simples o múltiples de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N-terminal. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

**b) Variantes de glucosilación**

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se altera para aumentar o disminuir el alcance hasta el que se glucosila un anticuerpo. La adición o eliminación de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede lograrse de manera conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de tal

modo que se crean o eliminan uno o más sitios de glucosilación.

En los casos donde el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido ramificado bicatenario que está generalmente unido mediante un enlace N al Asn297 del dominio CH2 de la región Fc (véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como fucosa unida a un GlcNAc en el "brote" de la estructura de oligosacárido biantenaria. En algunas realizaciones, pueden efectuarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser desde un 1 % hasta un 80 %, desde un 1 % hasta un 65 %, desde un 5 % hasta un 65 % o desde un 20 % hasta un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad media de fucosa dentro de la cadena del azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido en manosa) tal como se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tal como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de restos de región Fc); sin embargo, Asn297 también puede localizarse aproximadamente a ± 3 aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, los documentos US 2003/0157108; US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108, WO 2000/61739, WO 2001/29246; WO 2003/0115614; WO 2002/0164328; WO 2004/0093621; WO 2004/0132140; WO 2004/0110704; WO 2004/0110282; WO 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas

celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka, J. et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; documento US 2003/0157108; y el documento WO 2004/056312, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares *knockout*, tal como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8,* células CHO *knockout* (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; y el documento WO 2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpo con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en los que un oligosacárido bicantenario unido a la región Fc del anticuerpo se bisecciona mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2003/011878; US 6.602.684; y US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

**c) Variantes de región Fc**

En determinadas realizaciones, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que tiene algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable en aplicaciones donde la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero algunas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/eliminación de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto siendo probable que carezca de actividad de ADCC), pero que mantiene la capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar la ADCC, células

NK, solo expresan Fc(RIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en el documento US 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); documento US 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, La actividad de ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y por tanto carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para determinar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052; y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). También pueden efectuarse determinaciones de unión a FcRn y de eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769).

Los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos que tienen sustituciones en uno o más de los siguientes restos de la región Fc: 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (documento US 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de restos 265 y 297 a alanina (documento US 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR (véase, por ejemplo, los documentos US 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

En determinadas realizaciones, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración EU de restos).

En algunas realizaciones, se hacen alteraciones en la región Fc que dan como resultado una unión a C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, tal como se describe en los documentos US 6.194.551, WO 99/51642, e Idusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), se describen en el documento US 2005/0014934. Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del resto 434 de región Fc (documento US 7.371.826).

Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; documento US 5.648.260; documento US 5.624.821; y el documento WO 94/29351 que se refiere a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

**d) Variantes de anticuerpo diseñadas de cisteína**

En determinadas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos con cisteína diseñados mediante ingeniería genética, por ejemplo, “tioMAbs,” donde uno o más restos de un anticuerpo se han sustituido por restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se encuentran en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de esos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se colocan por tanto en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármacos o restos enlazantes de fármacos, para crear un inmunoconjugado, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas realizaciones, puede sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes restos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena

pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de cadena pesada. Los anticuerpos con cisteína diseñados mediante ingeniería genética se pueden generar como se describe, por ejemplo, en el documento US 7.521.541.

**e) Derivados de anticuerpos**

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede estar modificado adicionalmente para contener restos adicionales no proteínicos que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros al azar), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden tener las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, de si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de anticuerpo y restos no proteínicos que se pueden haber calentado selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañen a células normales, pero que calienten el resto no proteínico a una temperatura a la cual las células cercanas al resto no proteínico del anticuerpo se eliminan.

**B. Módulos de lanzadera de barrera hematoencefálica**

En una realización de todos los aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo

multiespecífico que tiene al menos una especificidad de unión por el receptor de transferrina y al menos una especificidad de unión por una diana terapéutica. En una realización, el anticuerpo comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al receptor de transferrina y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral. En una realización adicional, el antígeno cerebral se selecciona entre el grupo que consiste en Abeta, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), alfa-sinucleína, CD20, glucocerebrosidasa o proteína precursora de amiloide (APP). En una realización preferida, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a

i) el receptor de transferrina como a Abeta, o
ii) el receptor de transferrina como a CD20, o
iii) el receptor de transferrina como a alfa-sinucleína, o
iv) el receptor de transferrina como a fosfo-tau, o
v) el receptor de transferrina como a HER2, o
vi) el receptor de transferrina como a glucocerebrosidasa.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 81 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 82 de sitio de unión para Abeta.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 79 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 80 de sitio de unión para CD20 humano. En una realización, la región variable de cadena pesada comprende un reemplazo del resto de aminoácido en la posición 11 de Kabat por cualquier aminoácido excepto leucina. En una realización, la sustitución comprende el reemplazo del resto de aminoácido en la posición 11 de Kabat por un aminoácido no polar. En una realización preferida, la sustitución comprende un reemplazo del resto de aminoácido en la posición 11 de Kabat en el dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 79 por un resto de aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, y fenilalanina.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 84 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 85 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 86 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 87 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 88 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 89 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 90 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 91 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 92 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 93 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 94 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y un sitio de unión para glucocerebrosidasa humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 34 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 84 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 34 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 85 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 86 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 34 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 87 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 88 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 34 que forma un sitio de unión para el

receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 89 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 90 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 34 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 91 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 92 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 34 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de dominio variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 93 y un dominio variable de cadena pesada humanizada derivado de la SEQ ID NO: 94 de sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 34 que forma un sitio de unión para el receptor de transferrina y un sitio de unión para glucocerebrosidasa humana.

Las entidades de unión monovalentes que se unen específicamente a un receptor de barrera hematoencefálica pueden caracterizarse respecto a sus propiedades de unión y de transcitosis:

- unión celular eficiente de células que expresan BHER como entidad de unión monovalente,
- transcitosis *in vitro*eficaz como entidad de unión monovalente,
- reactividad cruzada con humano-macaco (por ejemplo, en experimentos BIAcore y FACS).

La exploración de la transcitosis puede llevarse a cabo en un ensayo basado en hCMEC/D3. El ensayo puede llevarse a cabo en un modo de pulso-captura. Las células endoteliales cerebrales hCMEC/D3 se incuban con la entidad de unión

monovalente durante 1 hora, se lavan posteriormente y se determinan los siguientes parámetros a las 0 horas y a las 4 horas después del lavado:

i) cantidad de entidad de unión monovalente captada en las células durante la fase de carga,
ii) cantidad basolateral de entidad de unión monovalente a las 4 horas después de la carga y el lavado;
iii) cantidad apical de entidad de unión monovalente a las 4 horas después de la carga y el lavado;
iv) cantidad de entidad de unión monovalente en las células (mediante lisis celular) a las 0 horas y 4 horas después de la carga y el lavado;
v) cantidad total de entidad de unión monovalente a las 0 horas y a las 4 horas después de la carga y el lavado.

Para que sea elegible como entidad de unión monovalente en un módulo de lanzadera de barrera hematoencefálica tal como se comunica en el presente documento, el anticuerpo anti-receptor de transferrina (por ejemplo, como entidad unión monovalente) tiene que i) ser captado por las células hCMEC/D3 (endocitosis), ii) ser transportado al exterior de las células hCMEC/D3 (exocitosis), e iii) ser estable dentro de las células hCMEC/D3 (transporte nulo o bajo a endosomas para su degradación).

Por tanto, en una realización, la entidad de unión monovalente se caracteriza en un ensayo basado en hCMEC/D3 mediante i) una captación (sustancial) al interior de las células hCMEC/D3 durante un periodo de carga de una hora, ii) una liberación en el compartimento apical y/o basolateral después del periodo de carga y una etapa de lavado a las 4 horas después del lavado, y iii) una baja velocidad de degradación (intracelular).

En una realización, la carga es a una concentración de aproximadamente 2,67 µg/ml de entidad de unión monovalente en una hora.

Se ha descubierto que para que una entidad de unión monovalente sea elegible como entidad de unión monovalente de un módulo de lanzadera de barrera hematoencefálica tal como se comunica en el presente documento tiene que mostrar en el ensayo basado en hCMEC/D3 descrito anteriormente los siguientes valores umbral:

i) una cantidad de entidad de unión monovalente captada en las células durante la fase de carga de 400 pg o más,
ii) cantidad basolateral de entidad de unión monovalente a las 4 horas

después de la carga y el lavado de 100 pg o más, y

ii) cantidad apical de entidad de unión monovalente a las 4 horas después de la carga y el lavado de 150 pg o más.

El anticuerpo de ratón anti-receptor de transferrina humano 128.1 (para las secuencias de la región variable véanse el documento WO 93/10819 y las SEQ ID NO: 64 y 65) puede tomarse como referencia. En este caso, para que una entidad de unión monovalente sea elegible como entidad de unión monovalente de un módulo de lanzadera de barrera hematoencefálica tal como se comunica en el presente documento tiene que mostrar en el ensayo basado en hCMEC/D3 descrito anteriormente los siguientes valores umbral:

i) una cantidad de entidad de unión monovalente captada en las células durante la fase de carga del 60 % o más de la carga de anticuerpo 128.1,

ii) una cantidad basolateral de entidad de unión monovalente a las 4 horas después de la carga y el lavado del 60 % o más de la cantidad basolateral del anticuerpo 128.1; y

iii) una cantidad apical de entidad de unión monovalente a las 4 horas después de la carga y el lavado del 60 % o más de la cantidad apical del anticuerpo 128.1.

El ensayo basado en hCMEC/D3 puede llevarse a cabo del modo siguiente (esta es una realización de todos los aspectos tal como se comunican en el presente documento):

Pueden obtenerse el medio y los suplementos para hCMEC/D3 (véase el documento WO 2006/056879 y Weksler, B.B., et al., FASEB J. 19 (2005) 1872-1874) de Lonza. Las células hCMEC/D3 (pases 26-29) se cultivan/pueden cultivarse hasta la confluencia en cubreobjetos (de microscopía) recubiertos con colágeno o matraces en medio EBM2 que contiene FBS al 2,5 %, una cuarta parte de los factores de crecimiento suministrados y complementarse completamente con la hidrocortisona, la gentamicina y el ácido ascórbico suministrados.

Para todos los ensayos de transcitosis, pueden usarse/se usan insertos de filtro de membrana de PET de alta densidad de poro ($1\times10^8$ poros/cm$^2$) (tamaño del poro de 0,4 µm, 12 mm de diámetro) en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Los volúmenes de medio se calculan para que sean de 400 µl y 1600 µl para las cámaras apical y lateral, respectivamente. Las cámaras apicales de los insertos de filtro se recubren/pueden recubrirse con colágeno I de cola de rata (7,5 µg/cm$^2$) seguido de fibronectina (5 µg/ml), durando cada incubación una hora a TA. Las

células hCMEC/D3 se cultivan/pueden cultivarse hasta monocapas confluentes (~$2\times10^5$ células/$cm^2$) durante 10-12 días en medio EBM2. Los filtros vacíos se bloquean/pueden bloquearse en PBS que contiene BSA al 1 % durante 1 hora o durante toda la noche (o/n) antes del ensayo y después se calibran durante 1 hora en medio EBM2 antes del ensayo.

El ensayo (para el esquema del ensayo véase la figura 1) se llevó a cabo en medio EBM2 sin suero que por lo demás se reconstituyó tal como se describe en el presente documento. En el día del ensayo, se priva de suero a las células durante 60 min para eliminar el ligando natural del receptor de la barrera hematoencefálica en cuestión. Los insertos de filtro con o sin células (pero bloqueados durante toda la noche en medio completo) se incubaron apicalmente con los anticuerpos monoclonales en cuestión (entidad de unión monovalente) durante 1 hora a 37 ℃. Se lavaron las monocapas a temperatura ambiente (TA) apicalmente en medio sin suero (400 µl) y basolateralmente (1600 µl) tres veces durante 3-5 min cada una. Se añadió medio precalentado a la cámara apical y se transfirieron los filtros a una placa nueva de 12 pocillos (bloqueada durante toda la noche con PBS que contenía BSA al 1 %) que contenía 1600 µl de medio precalentado. En este punto, se lisaron los filtros con o sin células en 500 µl de tampón RIPA para determinar la captación específica del anticuerpo (entidad de unión monovalente). Los demás filtros se incubaron a 37 ℃ o a 4 ℃ y se recogieron muestras en varios instantes para determinar la liberación apical y/o basolateral del anticuerpo (entidad de unión monovalente). El contenido de anticuerpo en las muestras puede cuantificarse usando un ELISA de IgG altamente sensible (véase el ejemplo 9). Para cada instante, deben generarse datos a partir de dos filtros vacíos y tres cultivos celulares en filtros.

**C. Métodos y composiciones recombinantes**

Pueden producirse anticuerpos usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en el documento US 4.816.567. En una realización, en el presente documento se proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-receptor de transferrina. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En dicha realización, una célula hospedadora comprende (por

ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (por ejemplo, Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para producir un anticuerpo anti-receptor de transferrina, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica al anticuerpo, tal como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o medio de cultivo de la célula hospedadora).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-receptor de transferrina, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, tal como se han descrito anteriormente, se aíslan e insertan en uno o más vectores para clonación adicional y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de los vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, el documento US 5.648.237, el documento US 5.789.199, y el documento US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., En: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores adecuados para clonación o expresión para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas rutas de glicosilación se han "humanizado" dando como resultado la producción de un

anticuerpo con un modelo de glicosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; y Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (vertebrados e invertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden usarse en conjunción con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véase, por ejemplo, el documento US 5.959.177, el documento US 6.040.498, el documento US 6.420.548, el documento US 7.125.978, y US 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también pueden usarse como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles células de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono trasformada mediante SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 tal como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 tal como se describen, por ejemplo, en Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, tal como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO $DHFR^-$ (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares de mamífero hospedadoras adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), págs. 255-268.

**D. Ensayos**

Los anticuerpos anti-receptor de transferrina proporcionados en el presente documento pueden identificarse, seleccionarse, o caracterizarse según sus propiedades físicas y químicas y/o actividades biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica.

**1. Ensayo de unión**

En un aspecto, se ensaya un anticuerpo de la invención respecto de su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante métodos conocidos tales como ELISA, alfaLISA, transferencia de Western, matriz de anticuerpo o de fase inversa, etc.

En un ensayo ELISA o alfaLISA ilustrativo, el receptor de transferrina en solución (sobrenadante celular, célula o lisados tisulares, fluidos corporales, etc) se une mediante un anticuerpo de captura, que se une específicamente a un primer epítopo en el receptor de transferrina, o al receptor de transferrina en una determinada conformación y se acopla un anticuerpo de detección a una entidad de detección, que se une específicamente a un segundo epítopo o conformación del receptor de transferrina. La lectura se basa en la entidad de detección (quimioluminiscencia, fluorescencia, luminiscencia inducida por transferencia de energía, etc.).

En el caso de una matriz de anticuerpo, se puntean los anticuerpos sobre microplacas de vidrio o nitrocelulosa. Los portaobjetos se bloquean y se incuban con solución que contiene receptor de transferrina, se lavan para eliminar los anticuerpos no unidos y se detectan los anticuerpos unidos con un anticuerpo secundario correspondiente marcado fluorescentemente. La señal de fluorescencia se mide mediante un escáner de portaobjetos de fluorescencia. De manera similar, para una matriz de fase inversa, se puntean sobre placas de vidrio o de nitrocelulosa el receptor de transferrina recombinante, sobrenadante celular, lisados celulares o tisulares, fluidos corporales, etc. Se bloquean los portaobjetos y se incuban las matrices individuales con un anticuerpo contra un epítopo específico en el receptor de transferrina. Los anticuerpos no unidos se eliminan por lavado y los anticuerpos unidos se detectan con un anticuerpo secundario correspondiente marcado fluorescentemente. La señal de fluorescencia se mide mediante un escáner de portaobjetos de fluorescencia (Dernick, G., et al., J. Lipid Res. 52 (2011) 2323-2331).

**E. Métodos y composiciones para diagnóstico y detección**

En determinadas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-receptor de

transferrina proporcionado en el presente documento es útil para detectar la presencia de receptor de transferrina humano en una muestra biológica. El término “detectar” tal como se utiliza en el presente documento abarca la detección cuantitativa y cualitativa. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido cerebral.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-receptor de transferrina para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia del receptor de transferrina en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-receptor de transferrina tal como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-receptor de transferrina al receptor de transferrina, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-receptor de transferrina y el receptor de transferrina. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el anticuerpo anti-receptor de transferrina se usa para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-receptor de transferrina, por ejemplo, en donde el receptor de transferrina es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ilustrativos que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen degeneración neurológica de tipo 1 con acumulación de hierro en el cerebro (NBIA1), fallo autónomo puro, síndrome de Down, complejo de Guam, y varios trastornos de cuerpos de Lewy, tales como la enfermedad de cuerpos de Lewy difusa (DLBD), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), determinadas formas de la enfermedad de Gaucher, y la demencia por enfermedad de Parkinson (PDD).

En determinadas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-receptor de transferrina marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromofóricos, densos a electrones, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ilustrativos incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos $^{32}P$, $^{14}C$, $^{125}I$, $^{3}H$, y $^{131}I$, fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (documento US 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,

β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófago, radicales libres estables, y similares.

**F. Formulaciones farmacéuticas**

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-receptor de transferrina tal como se describe en el presente documento se preparar mezclando dicho anticuerpo que tienen el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitación: tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (octadecil dimetilbencil cloruro de amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como poli(vinilpirrolidona); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos ejemplares farmacéuticamente aceptables en el presente documento incluyen adicionalmente agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutros-activos solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinados sHASEGP y métodos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en los documentos US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto, se combina un sHASEGP con uno o más gucosaminosacáridos adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpo liofilizado ejemplares en el documento US 6.267.958. Las formulaciones acuosas de anticuerpo incluyen aquellas descritas en los documentos US 6.171.586 y WO 2006/044908, estas últimas formulaciones incluyendo un tampón de histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichos principios activos están presentes de manera adecuada en combinaciones en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metil metacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen al anticuerpo, matrices que tienen la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son, generalmente, estériles. Puede lograrse fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

**G. Métodos terapéuticos y composiciones**

Cualquiera de los anticuerpos anti-TfR proporcionados en el presente documento pueden usarse en métodos terapéuticos. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TfR para su uso como medicamento. Por ejemplo, la invención proporciona un método para transportar un compuesto terapéutico a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer al anticuerpo anti-TfR acoplado a un compuesto terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que se une tanto a TfR como a un antígeno cerebral) para la BHE de tal forma que el anticuerpo transporta el compuesto terapéutico acoplado al mismo a través de la BHE. En otro ejemplo, la invención proporciona un método para transportar un fármaco para un trastorno neurológico a través de la barrera hematoencefálica que comprende

exponer un anticuerpo anti-TfR de la invención acoplado a un fármaco para un trastorno cerebral (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que se une tanto a TfR como a un antígeno cerebral) a la BHE de tal forma que el anticuerpo transporta el fármaco para un trastorno neurológico acoplado al mismo a través de la BHE. En una realización, la BHE está en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), por ejemplo, uno que tiene un trastorno neurológico, incluyendo, sin limitación: enfermedad de Alzheimer (AD), ictus, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer, lesión cerebral traumática, etc. En una realización, el trastorno neurológico se selecciona entre: una neuropatía, una amiloidosis, cáncer (por ejemplo, que afecta al SNC o al cerebro), una enfermedad o trastorno ocular, una infección vírica o microbiana, inflamación (por ejemplo, del SNC o del cerebro), isquemia, enfermedad neurodegenerativa, convulsiones, trastorno de la conducta, trastorno del almacenamiento lisosomal, etc. Los anticuerpos de la invención son particularmente adecuados para el tratamiento de dichos trastornos neurológicos debido a su capacidad para transportar uno o más ingredientes activos asociados/compuestos terapéuticos acoplados a través de la BHE y al interior del SNC/cerebro donde dichos trastornos tienen su base molecular, celular o vírica/microbiana. Los trastornos neuropáticos son enfermedades o anomalías del sistema nervioso caracterizadas por una señalización nerviosa inadecuada o no controlada o la ausencia de la misma, e incluyen, pero sin limitación, dolor crónico (incluyendo dolor nociceptivo), dolor causado por una lesión en los tejidos corporales, incluyendo el dolor relacionado con el cáncer, dolor neuropático (dolor causado por anomalías en los nervios, médula espinal, o cerebro), y dolor fisiogénico (relacionado en su totalidad o en su mayoría con un trastorno fisiológico), cefalea, migraña, neuropatía, y síntomas y síndromes que normalmente acompañan a dichos trastornos neuropáticos, tales como vértigo o náuseas.

Para un trastorno neuropático, puede seleccionarse un fármaco neurológico que es un analgésico incluyendo, pero sin limitación, un analgésico narcótico/opioide (es decir, morfina, fentanilo, hidrocodona, meperidina, metadona, oximorfona, pentazocina, propoxifeno, tramadol, codeína y oxicodona), un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) (es decir, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketorolac, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, oxaprozina, piroxicam, sulindaco, y tolmetina), un corticosteroide (es decir, cortisona, prednisona, prednisolona, dexametasona, metilprednisolona y tramcinolona), un agente anti-migraña (es decir,

sumatriptin, almotriptan, frovatriptan, sumatriptan, rizatriptan, eletriptan, zolmitriptan, dihidroergotamina, eletriptan y ergotamina), acetaminofén, un salicilato (es decir, aspirina, salicilato de colina, salicilato de magnesio, diflunisal, y salsalato), un anti-convulsionante (es decir, carbamazepina, clonazepam, gabapentina, lamotrigina, pregabalina, tiagabina, y topiramato), un anestésico (es decir, isoflurano, tricloroetileno, halotano, servoflurano, benzocaína, cloroprocaína, cocaína, ciclometicaína, dimetocaína, propoxicaína, procaína, novocaína, proparacaína, tetracaína, articaína, bupivacaína, carticaína, cinchocaína, etidocaína, levobupivacaína, lidocaína, mepivacaína, piperocaína, prilocaína, ropivacaína, trimecaína, saxitoxina y tetrodotoxina), y un inhibidor de cox-2 (es decir, celecoxib, rofecoxib, y valdecoxib). Para un trastorno neuropático con implicación de vértigo, puede seleccionarse un fármaco neurológico que sea un agente anti-vértigo incluyendo, pero sin limitación, meclizina, difenhidramina, prometazina y diazepam. Para un trastorno neuropático con implicación de náuseas, puede seleccionarse un fármaco neurológico que sea un agente anti-náuseas incluyendo, pero sin limitación, prometazina, clorpromazina, proclorperazina, trimetobenzamida, y metoclopramida.

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con depósitos proteináceos extracelulares en el SNC, incluyendo, pero sin limitación, amiloidosis secundaria, amiloidosis asociada a la edad, enfermedad de Alzheimer (AD), deterioro cognitivo leve (MCI), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo de Parkinson-demencia de Guam, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiforme transmisible, demencia relacionada con VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), y enfermedades oculares relacionadas con la deposición de beta-amiloide (es decir, degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusas, y cataratas).

Para la amiloidosis, puede seleccionarse un fármaco neurológico que incluye, pero sin limitación, un anticuerpo u otra molécula de unión (incluyendo, pero sin limitación, una molécula pequeña, un péptido, un aptámero, u otro agente de unión a proteínas) que se une específicamente a una diana seleccionada entre: beta-secretasa, tau, presenilina, proteína precursora de amiloide o porciones de la misma, péptido beta-amiloide u oligómeros o fibrillas del mismo, receptor de muerte 6 (DR6), receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE), parkina, y huntingtina; un inhibidor de colinesterasa (es decir, galantamina, donezepil, rivastigmina y tacrina); un

antagonista del receptor de NMDA (es decir, memantina), un eliminador de monoaminas (es decir, tetrabenazina); un mesilato ergoloide; un agente anti-parkinsonismo anticolinérgico (es decir, prociclidina, difenhidramina, trihexilfenidilo, benzotropina, biperidén y trihexilfenidilo); un agente anti-parkinsonismo dopaminérgico (es decir, entacapona, selegilina, pramipexol, bromocriptina, rotigotina, selegilina, ropinirol, rasagilina, apmorfina, carbidopa, levodopa, pergólido, tolcapona y amantadina); una tetrabenazina; un antiinflamatorio incluyendo, pero sin limitación, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (es decir, indometicina y otros compuestos listados anteriormente); una hormona (es decir, estrógeno, progesterona y leuprolida); una vitamina (es decir, folato y nicotinamida); una dimebolina; una homotaurina (Es decir, ácido 3-aminopropanosulfónico; 3APS); un modulador de la actividad del receptor de serotonina (es decir, xaliproden); un interferón, y un glucocorticoide.

Los cánceres del SNC están caracterizados por una proliferación aberrante de una o más células del SNC (es decir, una célula neural) e incluyen, pero sin limitación, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, astrocitoma, neuroma acústico, condroma, oligodendroglioma, meduloblastomas, ganglioglioma, Schwannoma, neurofibroma, neuroblastoma, y tumores extradurales, intramedulares, intradurales o metástasis del SNC de tumores periféricos, tales como cánceres positivos a CD20 o a HER2.

Para el cáncer, puede seleccionarse un fármaco neurológico que sea un agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetillolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocaptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sacrodictina; espongistatina;

mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliceamicina, especialmente caliceamicina gamma 1I y caliceamicina omega I1 (véase, por ejemplo, Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33 (1994) 183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína de enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICIN® doxorrubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-25 azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales como aminoglutimida, mitotano, trilostano; rellenador de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; 5 pipobromano; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers-Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ libre de Cremophor,

formulaciones en nanopartículas diseñadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), y TAXOTERE® docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura de una pauta terapéutica con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en esta definición de agentes quimioterapéuticos agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear, o inhibir los efectos de las hormonas que estimulan el crecimiento del cáncer, y a menudo están en forma de tratamiento sistémico o para todo el organismo. Puede tratarse de las propias hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; tamoxifeno), EVISTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; antiprogesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); agentes que funcionan para suprimir o apagar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), tales como LUPRON® y ELIGARD®, acetato de leuprolida, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestano, formestania, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, y ARIMIDEX® anastrozol. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), DIDROCAL® etidronato, NE-58095, ZOMETA® ácido zoledrónico/zoledronato, FOSAMAX® alendronato, AREDIA® pamidronato, 5 SKELID® tiludronato, o ACTONEL® risedronato; así como troxacitabina (un análogo de citosina en el nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, en particular aquellos que

inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas para terapia genética, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN®, y la vacuna VAXID®; LURTOTECAN® inhibidor de topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina cinasa dual para ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Otro grupo de compuestos que puede seleccionarse como fármaco neurológico para el tratamiento o prevención del cáncer son inmunoglobulinas anticáncer (incluyendo, pero sin limitación, trastuzumab, pertuzumab, bevacizumab, alemtuzumab, cetuximab, ozogamicina de gemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, panitumumab y rituximab). En algunos casos, pueden usarse anticuerpos en conjunción con un marcador o conjugado tóxico para dirigirse a y eliminar las células deseadas (es decir, células cancerosas), incluyendo, pero sin limitación, tositumomab con un radiomarcador de $^{131}$I, o trastuzumab emtansina.

Las enfermedades oculares son enfermedades o trastornos del ojo, que para los fines del presente documento se considera un órgano del SNC segregado por la BHE. Las enfermedades o trastornos oculares incluyen, pero sin limitación, trastornos de la esclerótica, córnea, iris y cuerpo ciliar (es decir, escleritis, queratitis, úlcera corneal, abrasión corneal, ceguera en la nieve, ojo arqueado, keratopatía puntuada superficial de Thygeson, neovascularización corneal, distrofia de Fuch, keratocono, keratoconjuntivitis seca, iritis y uveitis), trastornos de la lente (es decir, cataratas), trastornos de la coroide y la retina (Es decir, desprendimiento de retina, retinosquisis, retinopatía hipertensiva, retinopatía diabética, retinopatía, retinopatía del prematuro, degeneración macular asociada a la edad, degeneración macular (húmeda o seca), membrana epirretinal, retinitis pigmentosa y edema macular), glaucoma, flotadores, trastornos del nervio óptico y las vías visuales (es decir, neuropatía óptica hereditaria de Leber y drusas en el disco óptico), trastornos de los músculos oculares/acomodación del movimiento binocular/refracción (es decir, estrabismo, oftalmoparesis, oftalmoplegia externa progesiva, esotropía, exotropía, hipermetropía, miopía, astigmatismo, anisometropía, presbiopía y oftalmoplegia), alteraciones visuales y ceguera (es decir, ambilopía, amaurosis congénita de Lever, escotoma, ceguera al color, acromatopsia, nictalopía, ceguera, ceguera de río y microoftalmia/colomba), ojo rojo, pupila de Argyll Robertson, keratomicosis,

xeroftalmia y andaniridia.

Para una enfermedad o trastorno ocular, puede seleccionarse un fármaco neurológico que es un agente oftálmico anti-angiogénico (es decir, bevacizumab, ranibizumab y pegaptanib), un agente oftálmico para el glaucoma (es decir, carbacol, epinefrina, bromuro de demecario, apraclonidina, brimonidina, brinzolamida, levobunolol, timolol, betaxolol, dorzolamida, bimatoprost, carteolol, metipranolol, dipivefrin, travoprost y latanoprost), un inhibidor de anhidrasa carbónica (es decir, metazolamida y acetazolamida), un antihistamínico oftálmico (es decir, nafazolina, fenilefrina y tetrahidrozolina), un lubricante ocular, un esteroide oftálmico (es decir, fluorometolona, prednisolona, loteprednol, dexametasona, difluprednato, rimexolona, fluocinolona, medrisona y triamcinolona), un anestésico oftálmico (es decir, lidocaína, proparacaína y tetracaína), un anti-infeccioso oftálmico (es decir, levofloxacino, gatifloxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, cloranfenicol, bacitracina/polimixina B, sulfacetamida, tobramicina, azitromicina, besifloxacino, norfloxacino, sulfisoxazol, gentamicina, idoxuridina, eritromicina, natamicina, gramicidina, neomicina, ofloxacino, trifluridina, ganciclovir, vidarabina), un agente oftálmico antiinflamatorio (es decir, nepafenaco, ketorolac, flurbiprofeno, suprofeno, ciclosporina, triamcinolona, diclofenaco y bromfenaco), y un antihistamínico o descongestivo oftálmico (es decir, ketotifeno, olopatadina, epinastina, nafazolina, cromolina, tetrahidrozolina, pemirolast, bepotastina, nafazolina, fenilefrina, nedocromil, lodoxamida, fenilefrina, emedastina y azelastina).

Las infecciones víricas o microbianas del SNC incluyen, pero sin limitación, infecciones por virus (es decir, gripe, VIH, poliovirus, rubeola, ), bacterias (es decir, *Neisseria* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *E. coli*, *S. aureus*, *Pneumococcus* sp., *Meningococcus* sp., *Haemophilus* sp., y *Mycobacterium tuberculosis*) y otros microorganismos, tales como hongos (es decir, levaduras, *Cryptococcus neoformans*), parásitos (es decir, *Toxoplasma gondii*) o amebas que dan como resultado fisiopatologías del SNC incluyendo, pero sin limitación, meningitis, encefalitis, mielitis, vasculitis y abscesos, que pueden ser agudos o crónicos.

Para una enfermedad vírica o microbiana, puede seleccionarse un fármaco neurológico que incluye, pero sin limitación, un compuesto antivírico (incluyendo, pero sin limitación, un antivírico de adamantano (es decir, rimantadina y amantadina), un interferón antivírico (es decir, peg-interferón alfa-2b), un antagonista del receptor de quimiocinas (es decir, maraviroc), un inhibidor de la transferencia de la hebra de integrasa (es decir, raltegravir), un inhibidor de neuraminidasa (es decir,

oseltamivir y zanamivir), un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido (es decir, efavirenz, etravirina, delavirdina y nevirapina), nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa (tenofovir, abacavir, lamivudina, zidovudina, estavudina, entecavir, emtricitabina, adefovir, zalcitabina, telbivudina y didanosina), un inhibidor de proteasa (es decir, darunavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, indinavir y saquinavir), un nucleósido de purina (es decir, valaciclovir, famciclovir, aciclovir, ribavirina, ganciclovir, valganciclovir y cidofovir), y un antivírico misceláneo (es decir, enfuvirtida, foscarnet, palivizumab y fomivirsen)), un antibiótico (incluyendo, pero sin limitación, una aminopenicilina (es decir, amoxicilina, ampicilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucoxacilina, temocilina, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina o bacampicilina), una cefalosporina (es decir, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefamandol, ceftriaxona, cefotaxina, cefpodoxima, ceftazidima, cefadroxil, cefradina, loracarbef, cefotetan, cefuroxina, cefprozil, cefaclor, y cefoxitina), un carbapenem/penem (es decir, imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem y doripenem), un monobactam (es decir, aztreonam, tigemonam, norcardicin A y tabtoxinina-beta-lactama, un inhibidor de betalactamasa (es decir, ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam) en conjunción con otro antibiótico de beta lactama, un aminoglucósido (es decir, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomicina, tobramicina, y paromomicina), una ansamicina (es decir, geldanamicina y herbimicina), un carbacefem (es decir, loracarbef), un glucopéptido (es decir, teicoplanina y vancomicina), un macrólido (es decir, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espectinomicina), un monobactam (es decir, aztreonam), una quinolona (es decir, ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, ofloxacino, trovafloxacino, grepafloxacino, esparfloxacino y temafloxacino), una sulfonamida (es decir, mafenida, sulfonamidocrisoidina, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprima, trimetoprima y sulfametoxazol), una tetraciclina (es decir, tetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina y oxitetraciclina), un antibiótico antineoplásico o citotóxico (es decir, doxorrubicina, mitoxantrona, bleomicina, daunorrubicina, dactinomicina, epirrubicina, idarrubicina, plicamicina, mitomicina, pentostatina y valrubicina) y un compuesto antibacteriano misceláneo (es decir, bacitracina, colistina y polimixina B)), un antifúngico (es decir, metronidazol, nitazoxanida, tinidazol, cloroquina, indoquino y parmomicina, y un antiparasitario (incluyendo, pero sin limitación, quinina, cloroquina, amodiaquina, pirimetamina, sulfadoxina, proguanilo, mefloquina, atovaquona, primaquina, artemesinina, halofantrina,

doxiciclina, clindamicina, mebendazol, pamoato de pirantel, tiabendazol, dietilcarbamazina, ivermectina, rifampina, anfotericina B, melarsoprol, efornitina y albendazol).

La inflamación del SNC incluye, pero sin limitación, inflamación que está causada por una lesión en el SNC, que puede ser una lesión física (es decir, debido a un accidente, cirugía, traumatismo cerebral, lesión de la médula espinal, conmoción cerebral) o una lesión debida a o relacionada con otras una o más enfermedades o trastornos del SNC (es decir, absceso, cáncer, infección vírica o microbiana).

Para la inflamación del SNC, puede seleccionarse un fármaco neurológico que aborde la inflamación en sí (es decir, un agente antiinflamatorio no esteroideo, tal como ibuprofeno o naproxeno), o uno que trate la causa subyacente de la inflamación (es decir, un agente antivírico o anticanceroso).

Isquemia del SNC, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de trastornos relacionados con un flujo sanguíneo o un comportamiento vascular aberrante en el cerebro, o a las causas de este, e incluye, pero sin limitación: isquemia cerebral focal, isquemia cerebral global, ictus (es decir, hemorragia subaracnoidea y hemorragia intracraneal), y aneurisma.

Para la isquemia, puede seleccionarse un fármaco neurológico que incluye, pero sin limitación, un trombolítico (es decir, urocinasa, alteplasa, reteplasa y tenecteplasa), un inhibidor de la agregación plaquetaria (es decir, aspirina, cilostazol, clopidogrel, prasugrel y dipiridamol), una estatina (es decir, lovastatina, pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina, atorvastatina, simvastatina, cerivastatina y pitavastatina), y un compuesto para mejorar el flujo sanguíneo o la flexibilidad vascular, incluyendo, por ejemplo, medicaciones para la presión sanguínea.

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la pérdida de función o muerte de células neurales en el SNC, e incluyen, pero sin limitación: adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia, telangiectasia, enfermedad de Batten, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, degeneración causada por o asociada con la amiloidosis, ataxia de Friedreich, degeneración del lóbulo frontotemporal, enfermedad de Kennedy, atrofia multisistémica, esclerosis múltiple, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, atrofia muscular espinal, mielitis transversa, enfermedad de Refsum, y ataxia espinocerebelosa.

Para una enfermedad neurodegenerativa, puede seleccionarse un fármaco neurológico que sea una hormona del crecimiento o un factor neurotrófico; los ejemplos incluyen, pero sin limitación, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina-4/5, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-2 y otros FGF, neurotrofina (NT)-3, eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF)-alfa, TGF-beta, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1ra), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado glial (GDNF), neurturina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), herregulina, neurregulina, artemina, persefina, interleucinas, factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GFR), factor estimulador de colonias de granulocitos (CSF), CSF de granulocitos y macrófagos, netrinas, cardiotrofina-1, hedgehog, factor inhibidor de leucemia (LIF), midkina, pleiotrofina, proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), netrinas, saposinas, semaforinas, y factor de células madre (SCF).

Las enfermedades y trastornos comiciales del SNC implican una conducción eléctrica inadecuada y/o anormal en el SNC, e incluyen, pero sin limitación, epilepsia (es decir, crisis de ausencia, crisis atónicas, epilepsia Rolándica benigna, crisis de ausencia infantiles, crisis clónicas, crisis parciales complejas, epilepsia del lóbulo frontal, crisis febriles, espasmos infantiles, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia de ausencia juvenil, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Dravet, síndrome de Otahara, síndrome de West, crisis mioclónicas, trastornos mitocondriales, epilepsia mioclónica progresiva, crisis psicogénicas, epilepsia por reflejo, síndrome de Rasmussen, crisis parciales simples, crisis generalizadas secundarias, epilepsia del lóbulo temporal, crisis toniclónicas, crisis tónicas, crisis psicomotoras, epilepsia límbica, crisis de aparición parcial, crisis de aparición generalizada, estado epiléptico, epilepsia abdominal, crisis acinéticas, crisis autónomas, mioclono bilateral masivo, epilepsia cataménica, crisis de caída, crisis emocionales, crisis focales, crisis gelásticas, marcha Jacksoniana, enfermedad de Lafora, crisis motoras, crisis multifocales, crisis nocturnas, crisis fotosensible, seudocrisis, crisis sensoriales, crisis sutiles, crisis silvanas, crisis por abstinencia, y crisis por reflejo visual). Para un trastorno comicial, puede seleccionarse un fármaco neurológico que se un anticonvulsivo o antiepiléptico incluyendo, pero sin limitación, barbitúricos anticonvulsivos (es decir, primidona, metarbital, mefobarbital, alobarbital, amobarbital, aprobarbital, alfenal, barbital, bralobarbital y fenobarbital), barbitúricos benzodiacepínicos (es decir, diazepam, clonazepam, y lorazepam), anticonvulsionantes de carbamato (es decir, felbamato), anticonvulsionantes

inhibidores de la anhidrasa carbónica (es decir, acetazolamida, topimarato y zonisamida), anticonvulsionantes dibenzacepínicos (es decir, rufinamida, carbamazepina, y oxcarbazepina), anticonvulsionantes derivados de ácidos grasos (es decir, divalproex y ácido valproico), análogos del ácido gamma-aminobutírico (es decir, pregabalina, gabapentina y vigabatrina), inhibidores de la recaptación de ácido gamma-aminobutírico (es decir, tiagabina), inhibidores de la tansaminasa de ácido gamma-aminobutírico (es decir, vigabatrina), anticonvulsionantes de hidantoína (es decir, fenitoína, etotoína, fosfenitoína y mefenitoína), anticonvulsionantes misceláneos (es decir, lacosamida y sulfato de magnesio), progestinas (es decir, progesterona), anticonvulsionantes de oxazolidindiona (es decir, marametadiona y trimetadiona), anticonvulsionantes de pirrolidina (es decir, levitiracetam), anticonvulsionantes de succinimida (es decir, etosuximida y metsuximida), anticonvulsionantes de triazina (es decir, lamotrigina), y anticonvulsionantes de urea (es decir, fenacemida y feneturida).

Los trastornos del comportamiento son trastornos del SNC caracterizados por un comportamiento aberrante por parte del sujeto afectado e incluyen, pero sin limitación: trastornos del sueño (es decir, insomnio, parasomnias, terrores nocturnos, trastornos del sueño del ritmo circadiano, y narcolepsia), trastornos del estado de ánimo (es decir, depresión, depresión suicida, ansiedad, trastornos afectivos crónicos, fobias, ataques de pánico, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), trastorno de déficit de atención (TDA), síndrome de la fatiga crónica, agorafobia, trastorno por estrés postraumático, trastorno bipolar), trastornos alimenticios (es decir, anorexia o bulimia), psicosis, trastornos de comportamiento del desarrollo (es decir, autismo, síndrome de Rett, síndrome de Asperger), trastornos de la personalidad y trastornos psicóticos (es decir, esquizofrenia, trastorno delirante, y similares).

Para un trastorno de la conducta, puede seleccionarse un fármaco neurológico entre un compuesto modificador de la conducta incluyendo, pero sin limitación, un antipsicótico atípico (es decir, risperidona, olanzapina, apripiprazol, quetiapina, paliperidona, asenapina, clozapina, iloperidona y ziprasidona), un antipsicótico de fenotiazina (es decir, proclorperazina, clorpromazina, flufenazina, perfenazina, trifluoperazina, tioridazina y mesoridazina), un tioxanteno (es decir, tiotixeno), un antipsicótico misceláneo (es decir, pimozida, litio, molindona, haloperidol y loxapina), un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (es decir, citalopram, escitalopram, paroxetina, fluoxetina y sertralina), un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (es decir, duloxetina, venlafaxina, desvenlafaxina, un

antidepresivo tricíclico (es decir, doxepina, clomipramina, amoxapina, nortriptilina, amitriptilina, trimipramina, imipramina, protriptilina y desipramina), un antidepresivo tetracíclico (es decir, mirtazapina y maprotilina), un antidepresivo de fenilpiperazina (es decir, trazodona y nefazodona), un inhibidor de la oxidasa de monoamina (es decir, isocarboxazid, fenelzina, selegilina y tranilcipromina), una benzodiacepina (es decir, alprazolam, estazolam, flurazeptam, clonazepam, lorazepam y diazepam), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (es decir, bupropión), un estimulante del SNC (es decir, fentermina, dietilpropión, metanfetamina, dextroanfetamina, anfetamina, metilfenidrato, dexmetilfenidato, lisdexamfetamina, modafinilo, pemolina, fendimetrazina, benzfetamina, fendimetrazina, armodafinilo, dietilpropión, cafeína, atomoxetina, doxapram y mazindol), un ansiolítico/sedante/hipnótico (incluyendo, pero sin limitación, un barbitúrico (es decir, secobarbital, fenobarbital y mefobarbital), una benzodiacepina (tal como se describe anteriormente), y un ansiolítico/sedante/hipnótico misceláneo (es decir, difenhidramina, oxibato de sodio, zaleplon, hidroxizina, hidrato cloral, aolpidem, buspirona, doxepina, eszopiclona, ramelteon, meprobamato y etilclorvinol)), una secretina (véase, por ejemplo, Ratliff-Schaub et al. Autism 9 (2005) 256-265), un péptido opioide (véase, por ejemplo, Cowen et al., J. Neurochem. 89 (2004) 273-285), y un neuropéptido (véase, por ejemplo, Hethwa et al. Am. J. Physiol. 289 (2005) E301-305).

Los trastornos de almacenamiento lisosómico son trastornos metabólicos que en algunos casos se asocian con el SNC o tienen síntomas específicos en el SNC; dichos trastornos incluyen, pero sin limitación: enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, mucopolisacaridosis (tipos I, II, III, IV, V, VI y VII), enfermedad de almacenamiento de glucógeno, GM1-gangliosidosis, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Farber, leucodistrofia de Canavan, y lipofuscinosis ceroides neuronales de tipos 1 y 2, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Pompe, y enfermedad de Krabbe.

Para un trastorno del almacenamiento lisosomal, puede seleccionarse un fármaco neurológico que por sí mismo o de otro modo imita la actividad de la enzima que es disfuncional en la enfermedad. Las enzimas recombinantes ilustrativas para el tratamiento de trastornos del almacenamiento lisosómico incluyen, pero sin limitación, aquellas expuestas en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2005/0142141 (es decir, alfa-L20 iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-sulfatasa, alfa-N-acetilglucosaminidasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, beta-galactosidasa, arilsulfatasa B, beta-glucoronidasa, alfa glucosidasa

ácida, glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida, beta-galactocerebrosidasa, beta-galactosidasa, arilsulfatasa A, ceramidasa ácida, aspartocilasa, palmitoil-proteín tioesterasa 1 y tripeptidil amino peptidasa 1).

En un aspecto, se usa un anticuerpo de la invención para detectar un trastorno neurológico antes de la aparición de los síntomas y/o para evaluar la gravedad o duración de la enfermedad o el trastorno. En un aspecto, el anticuerpo permite la detección y/o la obtención de imágenes del trastorno neurológico, incluyendo obtención de imágenes mediante radiografía, tomografía, u obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad de la invención para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) sin eliminar glóbulos rojos sanguíneos (es decir, reticulocitos). En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad modificado para su uso en un método de tratamiento tal como se ha descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad modificado para mejorar su seguridad para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TfR (opcionalmente acoplado a un fármaco para un trastorno neurológico). En una realización similar, el método comprende adicionalmente administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un anticuerpo anti-TfR modificado para mejorar su seguridad para su uso en la reducción o inhibición de la formación de placa amiloide en un paciente en riesgo de padecer una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). Un "individuo" de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores es opcionalmente un ser humano. En determinados aspectos, el anticuerpo anti-TfR de la invención para su uso en los métodos de la invención mejora la captación del fármaco para el trastorno neurológico al que está acoplado.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad de la invención en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico. En una realización adicional, el medicamento es para su uso

en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico una cantidad eficaz del medicamento. En una realización similar, el método comprende adicionalmente administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene enfermedad de Alzheimer una cantidad eficaz de un anticuerpo multiespecífico de la invención que se une tanto a BACe1 como a TfR o tanto a Abeta como a TfR. En una realización similar, el método comprende adicionalmente administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

Los anticuerpos anti-TfR de la invención pueden usarse solos o en combinación con otros agentes en terapia. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TfR de la invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. En determinadas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente terapéutico eficaz para tratar el mismo trastorno neurológico o uno diferente para cuyo tratamiento se está empleando el anticuerpo anti-TfR. Los agentes terapéuticos ilustrativos incluyen, pero sin limitación: los diversos fármacos neurológicos descritos anteriormente, inhibidores de colinesterasa (tales como donepezil, galantamina, rovastigmina, y tacrina), antagonistas del receptor de NMDA (tales como memantina), inhibidores de la agregación de péptido beta amiloide, antioxidantes, moduladores de γ-secretasa, miméticos del factor de crecimiento nervioso (NGF) o terapia génica de NGF, agonistas de PPARγ, inhibidores de HMS-CoA reductasa (estatinas), anfacinas, bloqueadores de los canales de calcio, antagonistas de receptor de GABA, inhibidores de la glucógeno sintasa cinasa, inmunoglobulinas intravenosas, agonistas del receptor muscarínico, moduladores del receptor nicotínico, inmunización activa o pasiva de péptido beta amiloide, inhibidores de fosfodiesterasa, antagonistas del receptor de serotonina y anticuerpos anti-péptido beta amiloide. En determinadas realizaciones, el al menos un agente terapéutico adicional se selecciona respecto de su capacidad para mitigar uno o más efectos secundarios del fármaco neurológico.

En otras de estas realizaciones, el al menos un agente terapéutico adicional se selecciona respecto de su capacidad para inhibir o prevenir la activación de la ruta de complemento tras la administración del anticuerpo anti-TfR. Los ejemplos de

dichos agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, agentes que interfieren con la capacidad del anticuerpo anti-TfR para unirse a o activar la ruta de complemento y agentes que inhiben una o más interacciones moleculares con la ruta de complemento, y se describen generalmente en Mollnes y Kirschfink (Molec. Immunol. 43 (2006) 107-121), cuyo contenido se incorpora en la el presente documento expresamente por referencia.

Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente y en el presente documento abarcan administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en formulaciones separadas), y administrarse por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede tener lugar antes de, de manera simultánea, y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. En una realización, la administración del anticuerpo anti-TfR y la administración de un agente terapéutico adicional suceden en aproximadamente un mes, o entre aproximadamente una, dos o tres semanas, o entre aproximadamente una, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación con otras terapias interventivas, tales como, pero sin limitación, radioterapia, terapia conductual, u otras terapias conocidas en la técnica y adecuadas para el trastorno neurológico que se va a tratar o prevenir.

Un anticuerpo anti-TfR de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en el presente documento varias pautas de dosificación incluyendo, pero sin limitación a administraciones individuales o múltiples a lo largo de varios instantes, administración de bolo e infusión pulsada.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosifica, y administra de una forma consistente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios.

El anticuerpo no necesariamente, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes usados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión o para prevenir, mitigar o mejorar uno o más efectos secundarios de la administración del anticuerpo. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento, y de otros factores discutidos anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como las descritas en el presente documento, o a aproximadamente un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es adecuada.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros uno más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de terapias anteriores, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis de aproximadamente 1 μg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis inicial posible para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica estará en el intervalo de aproximadamente 1 μg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, el tratamiento será generalmente sostenido hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg o 40 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) se puede administrar al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis inicial más elevada, seguida por una o más dosis inferiores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. Se apreciará que un método para reducir el impacto en

las poblaciones de reticulocitos mediante administración de anticuerpos anti-TfR es modificar la cantidad o posología de las dosis, de tal forma que están presentes cantidades generalmente menores de anticuerpo circulante en el torrente sanguíneo para que interactúen con reticulocitos. En un ejemplo no limitativo, puede administrarse una dosis menor de los anticuerpos anti-TfR con mayor frecuencia de la que se podría con una dosis mayor. La dosificación usada puede equilibrarse entre la cantidad de anticuerpo que se necesita administrar al SNC (en sí relacionada con la afinidad de la porción específica de antígeno del SNC del anticuerpo), la afinidad de ese anticuerpo por TfR, y de si se administran con el anticuerpo conjuntamente o en serie o no compuestos protectores de los glóbulos rojos (es decir, reticulocitos), estimulantes del desarrollo o inhibidores de la ruta de complemento. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales, tal como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de un anticuerpo anti-TfR.

**III. Artículos de fabricación**

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto en o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un principio activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en este, en donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, en donde la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que

indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección concreta. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), suero salino tamponado con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los anteriores artículos de fabricación pueden incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-receptor de transferrina.

## IV. EJEMPLOS

Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras varias realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

### Materiales y métodos

#### Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos estándar para manipular el ADN tal como se describen en Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos moleculares biológicos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Síntesis de genes y oligonucleótidos

Los segmentos génicos deseados se prepararon mediante síntesis química en Geneart GmbH (Regensburg, Alemania). Los fragmentos génicos sintetizados se clonaron en un plásmido de *E. coli* para su propagación/amplificación. Las secuencias de ADN de fragmentos génicos subclonados se verificaron mediante secuenciación de ADN. Como alternativa, se ensamblaron fragmentos de ADN sintético cortos mediante hibridación con oligonucleótidos sintetizados químicamente o mediante PCR. Los oligonucleótidos respectivos se prepararon por Metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Alemania).

#### Reactivos

Todos los químicos comerciales, anticuerpos y kits se usaron tal como se

proporcionaron de acuerdo con el protocolo del fabricante, a menos que se indique lo contrario.

**Ejemplo 1**

**Inmunización de conejos y ratones**

Inmunización de ratones

Se inmunizó genéticamente a ratones NMRI, usando un vector de expresión de plásmido que codifica TfR de humano o de macaco de longitud completa mediante aplicación intradérmica de 100 µg de ADN de vector, seguido de electroporación (2 pulsos cuadrados de 1000 V/cm, duración 0,1 ms, intervalo 0,125 s; seguido de 4 pulsos cuadrados de 287,5 V/cm, duración 10 ms, intervalo 0,125 s. Los ratones recibieron 6 o 7 inmunizaciones consecutivas en los días 0, 14, 28, 42, 56, 70, y 84. Las inmunizaciones cuarta y sexta se llevaron a cabo con vector que codifica TfR de macaco; el vector que codifica TfR humano se usó para todas las demás inmunizaciones. Se extrajo sangre en los días 36, 78 y 92 y se preparó el suero, que se usó para la determinación del título mediante ELISA (véase más adelante). Los animales con los títulos mayores se seleccionaron para refuerzo en el día 96, mediante inyección intravenosa de $10^6$ células TF-1 humanas o de 50 µg de TfR humano soluble que carece del dominio helicoidal (dominio extracelular del TfR humano que comienza en Leu122, que termina en Asn608, expresado en células HEK293F como una fusión N-terminal con región Fc humana y purificado mediante cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaños, y se aislaron los anticuerpos monoclonales mediante tecnología de hibridoma, basándose en su capacidad para unirse al receptor de transferrina humano y de macaco expresado en la superficie de células CHO-K1 transfectadas de manera estable (véase el ejemplo 3).

Inmunización de conejos

Se inmunizó genéticamente ratones New Zealand White o ratones transgénicos que expresan un repertorio de anticuerpo humanizado, usando un vector de expresión de plásmido que codifica TfR de humano o de macaco de longitud completa mediante aplicación intradérmica de 400 µg de ADN de vector, seguido de electroporación (5 pulsos cuadrados de 750 V/cm, duración 10 ms, intervalo 1 s). Los conejos recibieron 6 inmunizaciones consecutivas en los días 0, 14, 28, 56, 84 y 112. Las inmunizaciones cuarta y sexta se llevaron a cabo con vector que codifica TfR de macaco; el vector que codifica TfR humano se usó para todas las demás

inmunizaciones. Se extrajo sangre (10 % del volumen total de sangre estimado) en los días 35, 63, 91 y 119. Se preparó el suero, que se usó para la determinación del título mediante ELISA (véase más adelante), y se aislaron células mononucleares periféricas, que se usaron como fuente de células B específicas de antígeno en el proceso de clonación de células B (véase el ejemplo 2).

Determinación de títulos en suero (ELISA)

Se inmovilizó TfR soluble humano recombinante (R&D Systems n.º de Cat. 2474-TR) en una placa de 96 pocillos NUNC Maxisorb a 3 µg/ml, 100 µl/pocillo, en PBS, seguido de: bloqueo de la placa con CroteinC al 2 % en PBS, 200 µl/pocillo; aplicación de diluciones en serie de antisueros, en duplicados, en CroteinC al 0,5 % en PBS, 100 µl/pocillo; detección con (1) anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a HRP (Jackson Immunoresearch/Dianova 115-036-071; 1/16 000) para todos los sueros de ratón, (2) anticuerpo de burro anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Jackson Immunoresearch/Dianova 711-036-152; 1/16 000) para todos los sueros de conejo, (3) anticuerpo de conejo anti-IgG humana (Pierce/Thermo Scientific 31423; 1/5000) solo para los sueros de conejos transgénicos, (4) anticuerpo de cabra anti-kappa humana biotinilado (Southern Biotech/Biozol 2063-08, 1/5 000) y estreptavidina-HRP solo para sueros de conejos transgénicos; diluido en CroteinC al 0,5 % en PBS, 100 µl/pocillo. Para todas las etapas, se incubaron las placas durante 1 h a 37 ℃. Entre todas las etapas, las placas se lavaron 3 veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS. La señal se reveló mediante la adición de sustrato soluble BM Blue POD (Roche), 100 µl/pocillo; y se detuvo mediante la adición de HCl 1 M, 100 µl/pocillo. La absorbancia se leyó a 450 nm, frente a 690 nm como referencia. El título se definió como la dilución de antisuero que diese como resultado una señal semimáxima.

**Ejemplo 2**

**Clonación de células B de conejo**

Aislamiento de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) de conejo

Se tomaron muestras de sangre de en resumen 6 animales (2 conejos de tipo silvestre (wt) y 4 conejos transgénicos (tg)). Estos conejos procedían de 2 campañas de inmunización diferentes: la primera campaña con 2 conejos wt y 2 tg y la segunda campaña con 2 conejos tg (véase también el ejemplo "Inmunización de conejos"). Se diluyó sangre completa que contenía EDTA con PBS 1x (PAA, Pasching, Austria) antes de la centrifugación de densidad usando linfolite de mamífero (Cedarlane

Laboratories, Burlington, Ontario, Canadá) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se lavan las PBMC dos veces con PBS 1x.

Medio EL-4 B5

RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) suplementado con FCS al 10 % (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.), glutamina 2 mM, solución de penicilina/estreptomicina al 1 % (PAA, Pasching, Austria), piruvato sódico 2 mM, HEPES 10 mM (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y β-mercaptoetanol 0,05 mM (Gibco, Paisley, Escocia).

Eliminación de células

Primera campaña de inmunización: Se usaron placas de 6 pocillos estériles (de grado de cultivo celular) cubiertas con una monocapa confluente de células CHO para eliminar macrófagos/monocitos mediante adhesión inespecífica así como unión no específica de linfocitos.

Segunda campaña de inmunización: Se omitió la etapa de eliminación usando pocillos recubiertos con células CHO ya que no se excluirían aquellas células B que producen anticuerpos que tienen reactividad cruzada con el receptor de transferrina de hámster, que se eliminarían. Por lo tanto, se usaron placas de 6 pocillos en blanco estériles (de grado de cultivo celular) para eliminar macrófagos y monocitos mediante adhesión inespecífica, permitiendo linfocitos-B potenciales que producen anticuerpos de superficie con reactividad cruzada con hámster (y posiblemente con reactividad cruzada con ratón) para llegar a la siguiente etapa en el flujo de trabajo.

Para cada campaña de inmunización: se filtró cada pocillo al máximo con 4 ml de medio y se dejó que se unieran hasta $6x10^6$ PBMC del conejo inmunizado durante 1 h a 37 ℃ en el incubador. Las células en el sobrenadante (linfocitos de sangre periférica (PBL)) se usaron para la etapa de paneo de antígeno.

Enriquecimiento de células B en el receptor de transferrina humano

Se sembraron placas de cultivo tisular de 6 pocillos cubiertas con una monocapa de células CHO positivas a receptor de transferrina humano con hasta $6x10^6$ PBL por 4 ml de medio y se dejó que se unieran durante 1 h a 37 ℃ en el incubador. Las células no adherentes se eliminaron lavando cuidadosamente los pocillos 1-2 veces con PBS 1x. Las células adherentes restantes se desprendieron con tripsina durante 10 min a 37 ℃ en el incubador. Se detuvo la tripsinización con medio EL-4 B5. Las células se mantuvieron sobre hielo hasta la tinción inmunológica de fluorescencia.

Tinción inmunofluorescente y citometría de flujo

Se usó FITC anti-IgG (AbD Serotec, Düsseldorf, Alemania) para la clasificación de células individuales. Para la tinción de superficie, se incubaron células de la etapa de eliminación y enriquecimiento con el anticuerpo FITC anti-IgG en PBS y se incubaron durante 45 min en la oscuridad a 4 ℃. Después de teñir las PBMC, se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. Finalmente, los PBMC se resuspendieron en PBS enfriado en hielo y se sometieron inmediatamente a los análisis FACS. Se añadió yoduro de propidio a una concentración de 5 µg/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.) antes de los análisis FACS para discriminar entre células muertas y vivas.

Se usó un FACSAria de Becton Dickinson con un ordenador y el programa FACSDiva (BD Biosciences, EE.UU) para la clasificación de células individuales.

Cultivo de células B

El cultivo de células B de conejo se preparó mediante un método similar al descrito por Zubler et al. (1985). En resumen, las células B de conejo individuales clasificadas se incubaron en placas de 96 pocillos con 200 µl/pocillo de medio EL-4 B5 que contenía células Pansorbin (1:100000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), sobrenadante de timocitos de conejo al 5 % (carga TSN-M13 (10242), MicroCoat, Bernried, Alemania) y células de timoma murino EL-4-B5 irradiadas con radiación gamma ($2{,}5 \times 10^4$/pocillo) durante 7 días a 37 ℃ en una atmósfera de $CO_2$ al 5 % en el incubador. Se retiraron los sobrenadantes del cultivo de células B para su exploración y se recogieron las células restantes inmediatamente y se congelaron a -80 ℃ en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

**Ejemplo 3**

**Identificación de anticuerpos de unión a TfR humano y de macaco mediante ELISA celular**

Para explorar sobrenadantes de células B de conejo o de hibridoma de ratón respecto de anticuerpos que reconocen a TfR humano y de macaco, se empleó un ELISA celular que usaba células CHO-K1 transfectadas de manera estable. Se obtuvieron transfectantes estables transfectando células CHO-K1 con plásmidos de expresión que contenían casetes de expresión para el TfR de ser humano y de macaco así como para neomicina-fosfotransferasa. Después de la transfección, se diluyeron las células en medio de cultivo que contenía 500 µg/ml de G418 (Life Technologies). Después de la aparición de clones en crecimiento, se desprendieron las células, se tiñeron con MEM-75 (Abcam) o 13E4 (Life Technologies) y

anticuerpos secundarios marcados con PE para TfR humano o de macaco, y las células altamente fluorescentes se clasificaron como células individuales en los pocillos de una placa de 96 pocillos (FACS Aria). Después de 7 días de crecimiento, se comprobó de nuevo los clones respecto de expresión de TfR y se seleccionaron los clones con mejor expresión para los experimentos de ELISA celular.

En resumen, se sembraron 15.000 células por pocillo de una placa de 384 pocillos y se incubaron durante 18 h a 37 ℃, $CO_2$ al 5 %. Se retiró el sobrenadante usando un lavador automático (BIOTEK), y se añadieron a cada pocillo 30 µl de sobrenadante que contenía anticuerpo, seguido de 24 µL de medio de crecimiento. Después de 2 horas de incubación, se vaciaron los pocillos y se añadieron 30 µL de glutaraldehído al 0,05 % en PBS durante 45 min a TA. Después de 3 lavados con PBS/Tween20 al 0,025 % (PBST), se añadieron 30 µl de anti-conejo-HRP o anti-ratón-HRP (Southern Biotech) diluido a 1:5000 en tampón de bloqueo y se incubaron las placas durante 1 hora a TA. Las células se lavaron 6 veces con PBST y se generó la señal usando 30 µl de TMB por pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm.

**Ejemplo 4**

**Clonación y expresión de anticuerpos anti-TfR**

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos estándar para manipular el ADN tal como se describen en Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos moleculares biológicos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Síntesis de genes y oligonucleótidos

Los segmentos génicos deseados se prepararon mediante síntesis química en Geneart GmbH (Regensburg, Alemania). Los fragmentos génicos sintetizados se clonaron en un plásmido de *E. coli* para su propagación/amplificación. Las secuencias de ADN de fragmentos génicos subclonados se verificaron mediante secuenciación de ADN. Como alternativa, se ensamblaron fragmentos de ADN sintético cortos mediante hibridación con oligonucleótidos sintetizados químicamente o mediante PCR. Los oligonucleótidos respectivos se prepararon por Metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Alemania).

Amplificación PCR de los dominios V

Se preparó ARN total a partir de lisado de células B (resuspendido en tampón RLT -

Qiagen - n.º de Cat. 79216) usando el kit para ARN NucleoSpin 8/96 (Macherey&Nagel; 740709,4, 740698) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN se eluyó con 60 µl de agua sin RNasa. Se usaron 6 µl de ARN para generar ADNc mediante reacción de transcriptasa inversa usando Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) y un cebador oligo-dT de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las etapas se llevaron a cabo en un sistema Hamilton ML Star. Se usaron 4 µl de ADNc para amplificar las regiones variables de la cadena ligera y pesada (VH y VL) de inmunoglobulina con el kit AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040) en un volumen final de 50 µl usando los cebadores rbHC.up y rbHC.do para la cadena pesada, rbLC.up y rbLC.do para la cadena ligera del conejo B de tipo silvestre y BcPCR_FHLC_líder.fw y BcPCR_huCkappa.rev para la cadena ligera de células B de conejo transgénico (véase la tabla a continuación). Todos los cebadores directos eran específicos para el péptido de señal (respectivamente de VH y VL) mientras que los cebadores inversos eran específicos para las regiones constantes (respectivamente de VH y VL). Las condiciones PCR para RbVH+RbVL fueron las siguientes: Comienzo en caliente a 94 ℃ durante 5 min; 35 ciclos de 20 s a 94 ℃, 20 s a 70 ℃, 45 s a 68 ℃, y extensión final a 68 ℃ durante 7 min. Las condiciones PCR para la HuVL fueron las siguientes: Comienzo en caliente a 94 ℃ durante 5 min; 40 ciclos de 20 s a 94 ℃, 20 s a 52 ℃, 45 s a 68 ℃, y una extensión final a 68 ℃ durante 7 min.

| | |
|---|---|
| rbHC.up (SEQ ID NO: 103) | AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC |
| rbHCf.do (SEQ ID NO: 104) | CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG |
| rbLC.up (SEQ ID NO: 105) | AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC |
| rbLC.do (SEQ ID NO: 106) | CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC |
| BcPCR_FHLC_líder.fw (SEQ ID NO: 107) | ATGGACATGAGGGTCCCCGC |
| BcPCR_huCkappa.rev (SEQ ID NO: 108) | GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC |

Se cargaron 8 µl de 50 µl de solución PCR en un 48 E-Gel al 2 % (Invitrogen G8008-02). Las reacciones positivas PCR se lavaron usando el kit NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se eluyeron en 50 µl de tampón de elución. Todas las etapas de lavado se llevaron a

cabo en un sistema Hamilton ML Starlet.

Expresión recombinante de anticuerpos bivalentes monoclonales de conejo

Para la expresión recombinante de anticuerpos bivalentes monoclonales de conejo, se clonaron los productos de PCR para VH o VL como ADNc en vectores de expresión mediante el método de clonación de protuberancias (RS Haun et al., BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Los vectores de expresión contenían un casete de expresión que consistía en un promotor de CMV 5' que incluía el intrón A, y una secuencia de poliadenilación de BGH 3'. Además del casete de expresión, los plásmidos contenían un origen de replicación derivado de pUC18 y un gen de beta-lactamasa que confería resistencia a la ampicilina para la amplificación del plásmido en *E. coli*. Se usaron tres variantes del plásmido básico: un plásmido que contenía la región constante de IgG diseñada para aceptar las regiones VH mientras que dos plásmidos adicionales contenían LC kappa de conejo o humana para aceptar las regiones VL.

Los plásmidos de expresión linealizados que codificaban la región constante kappa o gamma y los insertos VL/VH se amplificaron mediante PCR usando cebadores solapantes.

Los productos PCR purificados se incubaron con T4 ADN polimerasa que generó protuberancias monocatenarias. La reacción se detuvo mediante la adición de dCTP.

En la etapa siguiente, se combinaron el plásmido y el inserto y se incubaron con recA que indujo recombinación de sitio específico. Los plásmidos recombinantes se transformaron en *E. coli*. Al día siguiente, las colonias crecidas se recogieron y ensayaron respecto del plásmido correctamente recombinado mediante preparación de plásmido, análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Para la expresión de anticuerpo, se co-transfectaron los plásmidos de HC y LC aislados en células HEK293 y se recogieron los sobrenadantes después de 1 semana.

Generación de vectores para la expresión de anticuerpos monovalentes monoclonales de conejo

Para la expresión recombinante de los candidatos seleccionados como anticuerpos monovalentes monoclonales, se convirtieron las regiones constantes de conejo de todas las cadenas VH en regiones constantes humanas que encerraban una mutación de pomo en el segmento CH3. Para las cadenas VL procedentes de

células B de tipo silvestre de conejo, se hicieron humanas las regiones constantes C kappa de conejo. Se usaron 4 µl de ADNc de los candidatos seleccionados para amplificar las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina con AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040) en un volumen final de 50 µl con cebadores directos específicos para el péptido de señal y cebadores inversos específicos para la región CDR3-J con (en el extremo 3') secuencia solapante (20 pb) homóloga a las regiones constantes humanas (de VH y VL, respectivamente). Las condiciones de la PCR para la amplificación de las cadenas VH y VL fueron las siguientes: Comienzo en caliente a 94 ℃ durante 5 min; 35 ciclos de 20 s a 94 ℃, 20 s a 68 ℃, 45 s a 68 ℃, y una extensión final a 68 ℃ durante 7 min.

Se clonaron los productos de PCR para VH o VL como ADNc en vectores de expresión mediante el método de clonación de protuberancias (RS Haun et al., BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Los vectores de expresión contenían un casete de expresión que consistía en un promotor de CMV 5' que incluía el intrón A, y una secuencia de poliadenilación de BGH 3'. Además del casete de expresión, los plásmidos contenían un origen de replicación derivado de pUC18 y un gen de beta-lactamasa que confería resistencia a la ampicilina para la amplificación del plásmido en *E. coli*. Se usaron dos variantes del plásmido básico: un plásmido que contenía la región constante de IgG humana diseñada para aceptar la nueva cadena VH amplificada y un segundo plásmido que contenía la región constante LC kappa humana para aceptar la cadena VL.

Los plásmidos de expresión linealizados que codificaban la región constante kappa o gamma y los insertos VL/VH se amplificaron mediante PCR usando cebadores solapantes.

Los productos PCR purificados se incubaron con T4 ADN polimerasa que generó protuberancias monocatenarias. La reacción se detuvo mediante la adición de dCTP.

En la etapa siguiente, se combinaron el plásmido y el inserto y se incubaron con recA que indujo recombinación de sitio específico. Los plásmidos recombinantes se transformaron en *E. coli*. Al día siguiente, las colonias crecidas se recogieron y ensayaron respecto del plásmido correctamente recombinado mediante preparación de plásmido, análisis de restricción y secuenciación de ADN.

**Ejemplo 5**

**Expresión transitoria de los anticuerpos anti-TfR monovalentes**

Los anticuerpos se generaron *in vivo* en células HEK293 transfectadas de manera transitoria (derivadas de la línea celular 293 de riñón embrionario humano) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección "sin 293", se usó reactivo de transfección (Novagen). Los anticuerpos y las moléculas modificadas basadas en anticuerpos, tal como se describieron anteriormente, se expresaron a partir de plásmidos de expresión individuales. Las transfecciones se llevaron a cabo tal como se especifica en las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de cultivo que contenían proteína recombinante se recogieron de tres a siete días después de la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron a temperatura reducida (por ejemplo, a -80 ℃) hasta su purificación.

La información general referente a la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas en, por ejemplo, células HEK293 se proporciona en: Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

**Ejemplo 6**

**Purificación de anticuerpos para el receptor de transferrina monobrazo en alto rendimiento**

Se cargaron los 50 ml de sobrenadantes aclarados que contenían anticuerpos monobrazo en placas de 96 pocillos profundos en columnas MabSelectSure de 200 µL. Después de las etapas de lavado con PBS a pH 7,4, se eluyeron las proteínas con HCl 2,5 mM usando el sistema Tecan/Atoll dando como resultado 0,5 ml de eluato. El eluato se neutralizó mediante Tris 2 M, pH 8. Las proteínas purificadas se cuantificaron usando un espectrofotómetro Nanodrop y se analizaron mediante CE-SDS en condiciones desnaturalizantes y reductoras y SEC analítica. Para obtener proteína con alta pureza (> 95 %), se tiene que purificar una gran proporción de los anticuerpos adicionalmente en cromatografía de exclusión por tamaño para separar los medios anticuerpos, los anticuerpos pomo-pomo y agregados de mayor orden. En los 500 µl siguientes se inyectaron las muestras en Superdex200 10/300GL en histidina 20 mM que contenía 140 mM de NaCl pH 6,0 usando Dionex UltiMate 3000. Este método permite fraccionar 25-30 muestras/día y por lo tanto permite refinar una gran número de aciertos de exploración en formato monobrazo. Las fracciones se agruparon y analizaron de nuevo tal como se ha descrito anteriormente.

**Ejemplo 7**

**Cultivo de células hCMEC/D3 para ensayos de transcitosis**

Se obtuvieron el medio y los suplementos para hCMEC/D3 (Weksler, B.B., et al., FASEB J. 19 (2005) 1872-1874) de Lonza. Las células hCMEC/D3 (pases 26-29) se cultivaron hasta la confluencia en cubreobjetos (de microscopía) recubiertos con colágeno o matraces en medio EBM2 que contiene FBS al 2,5 %, una cuarta parte de los factores de crecimiento suministrados y complementarse completamente con la hidrocortisona, gentamicina y ácido ascórbico.

Para todos los ensayos de transcitosis, se usaron insertos de filtro de membrana de PET de alta densidad de poro ($1\times10^8$ poros/cm$^2$) (0,4 µm, 12 mm de diámetro) en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Los volúmenes de medio óptimos se calcularon para que sean de 400 µl y 1600 µl para las cámaras apical y lateral, respectivamente. Las cámaras apicales de los insertos de filtro se recubrieron con colágeno I de cola de rata (7,5 µg/cm$^2$) seguido de fibronectina (5 µg/ml), durando cada incubación 1 hora a TA. Las células hCMEC/D3 se cultivaron hasta monocapas confluentes (~$2\times10^5$ células/cm$^2$) durante 10-12 días en medio EBM2.

**Ejemplo 8**

**Ensayo de transcitosis de anticuerpos monovalentes**

El ensayo completo se llevó a cabo en medio EBM2 sin suero que por lo demás se reconstituyó tal como se describe en el ejemplo 1. Se incubaron los insertos de filtro apicalmente con anticuerpos monovalentes (concentración: 2,67 µg/ml) durante 1 hora a 37 ℃ después de lo cual se recogieron completamente los medios apical y basolateral. A partir de estos valores, se calculó el flujo paracelular. Las monocapas se lavaron a TA en medio sin suero apicalmente (400 µL) y basolateralmente (1600 µl) 3 x 3-5 min. cada una. Todos los lavados se recogieron para controlar la eficacia de la eliminación del anticuerpo no unido. Se añadió medio precalentado a la cámara apical y se transfirieron los filtros a una placa nueva de 12 pocillos (bloqueada durante toda la noche con PBS que contenía BSA al 1 %) que contenía 1600 µl de medio precalentado. En este punto, las células sobre los filtros se lisaron en 500 µl de tampón RIPA para determinar la captación específica de anticuerpo. Los demás filtros se incubaron a 37 ℃ y se recogieron muestras en varios instantes para determinar la liberación apical y/o basolateral del anticuerpo. El contenido de anticuerpo en las muestras se cuantificó usando un ELISA de IgG altamente sensible (véase el ejemplo 3). Para cada instante, se generaron datos a partir de tres cultivos celulares en filtro.

**Ejemplo 9**

**ELISA de IgG sensible después del ensayo de transcitosis**

Se llevó a cabo el procedimiento completo a TA usando un lavador automatizado para las etapas de lavado. Se recubrió una placa de 384 pocillos con 30 µl/pocillo de IgG anti-humano/ratón 1 µg/ml, específica de Fcγ en PBS durante 2 horas seguido de incubación durante 1 hora en tampón de bloqueo PBS que contenía BSA al 1 % o CroteinC al 1 % para los ensayos de IgG humana y de ratón, respectivamente). Se añadieron muestras diluidas en serie del ensayo de transcitosis y concentraciones estándar del anticuerpo usado en el ensayo de transcitosis a la placa y se incubaron durante 2 horas. Después de cuatro lavados, se añadieron 30 µl/pocillo de anti-humano/ratón-F(ab)2-Biotina a 50 ng/ml en tampón de bloqueo y se incubó durante 2 horas adicionales. Después de 6 lavados, se añadieron 30 µl/pocillo de 50 ng/ml (ensayo de huIgG) o de 100 ng/ml (ensayo de mIgG) de Poli-HRP40-estreptavidina (Fitzgerald; en PBS que contenía BSA al 1 % y Tween-20 al 0,05 %) y se incubó durante 30 min. Después de 4 lavados, se detectaron los complejos inmunes mediante adición de 30 µl/pocillo de sustrato de quimioluminiscencia BM (Roche). Se midió la señal de luminiscencia usando un lector de placas de luminiscencia y se calculó la concentración usando la curva patrón ajustada. La sensibilidad del ensayo osciló de 10 pg/ml a 10 ng/ml.

**Ejemplo 10**

**Mapeo de epítopos mediante ELISA de células CHO transfectadas con mutantes de hTfR**

Para ser capaces de determinar las regiones de epítopo en el receptor de transferrina humano (hTfR), se introdujeron mutaciones en posiciones de la secuencia de hTfR, en donde un grupo de aminoácidos expuestos en la superficie tenían diferentes aminoácidos en la secuencia de TfR de ratón alineada (véase la tabla a continuación), siguiendo el razonamiento de que a pesar de la significativa homología entre TfR humano y de ratón (identidad del 77 %), no se conocen anticuerpos dirigidos contra la parte extracelular que muestren buena reactividad cruzada entre ambos ortólogos. La clonación del plásmido con las correspondientes mutaciones se ha descrito anteriormente. Para mapear la unión de moléculas de unión a TfR humano a esos epítopos, se transfectaron transitoriamente células CHO-K1 con los plásmidos descritos y se midió la unión de anticuerpo en un ELISA celular. En resumen, se emplacaron $10^4$ células por pocillo de una placa de 96 pocillos el día antes del experimento en medio de crecimiento normal (RPMI/FCS al

10 %). Al día siguiente, se cambió el medio a medio reducido en suero OPTI-MEM (Gibco), y se añadieron 10 µl de una mezcla de 1200 µl de OPTI-MEM, 12 µg de ADN de plásmido y 12 µl de reactivo de transfección XtremeGENE (Roche) a los pocillos después de 30 minutos de preincubación. Las células se incubaron durante 2 días a 37 ℃/$CO_2$ al 7,5 %, después se retiró el medio y se añadieron los anticuerpos para TfR a concentraciones entre 1 nM y 100 nM en medio de crecimiento, seguido de 2 h de incubación a 4 ℃. P osteriormente, se reemplazaron las soluciones de anticuerpo por glutaraldehído al 0,05 % en PBS y se fijaron las células durante 15 min a TA, después se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario anti-Fc humano conjugado a HRP (BioRad; 1:2000 en reactivo de bloqueo de ELISA (Roche)) durante 1,5 horas a TA. La señal se generó después de 3 lavados con PBS usando50 µl de TMB por pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm.

| **Plásmido n.º** | **mutaciones en hTfR** |
|---|---|
| 10188 | - |
| 18909 | Thr518Asp/Gln520Lys/Phe521Ser/Gln524Arg |
| 18910 | Arg325Gln |
| 18911 | Ser355Ala/Asp356Arg/Lys358Asn/Thr359Ile |
| 18912 | Asp204Gln/Lys205Ser/Arg208Asn |
| 18913 | Lys574Gly/Glu575Ala/Ile577Thr/Glu578Gln |
| 18914 | Ala196Ile/Gln197Gly/Asn198Gln/Ser199Asn/Val200Met/Ile201Val/Ile202Thr/Val203Ile/Asp204Val/Lys205Gln/Asn206Ser/Gly207Asn/Arg208Gly/Leu209Asn/Val210Leu/Tyr211Asp/Leu212Pro |
| 18974 | Asp245Glu/Tyr247Ser/Thr248Tyr/Pro249Ser |

**<u>Ejemplo 11</u>**

**Ensayo de unión basado en resonancia de plasmón superficial para la interacción TfR humano-anticuerpo**

Los experimentos de unión se llevaron a cabo en un dispositivo BIAcore B 4000 (GE Healthcare) equipado con placa sensora C1 (GE Healthcare, n.º de Cat. BR1005-35) pretratada con anticuerpo anti-Fab humano (GE Healthcare, n.º de cat. 28-9583-25) usando un procedimiento de química de acoplamiento de amina convencional de acuerdo con el manual del vendedor.

Para las medidas cinéticas, el anticuerpo de muestra se inmovilizó aplicando un tiempo de contacto de 60 segundos y un caudal de 10 µl/min en suero salino

tamponado con fosfato a pH 7,4, Tween 20 al 0,05 % a 25 ℃. Se aplicó receptor de transferrina humano marcado con His6 recombinante (R&D Systems, n.º de cat. 2474-TR-050) a concentraciones crecientes y se controló la señal con el paso del tiempo. Se registraron un espacio de tiempo medio de 150 segundos de tiempo de asociación y 600 segundos de tiempo de disociación con un caudal de 30 µl/min. Los datos se ajustaron usando un modelo de unión 1:1 (isoterma de Langmuir).

**Ejemplo 12**

**Humanización de los dominios VH y VL de anticuerpo anti-receptor de transferrina murino y de conejo**

Los anticuerpos anti-receptor de transferrina no humanos se humanizaron del modo siguiente: Basándose en la caracterización de secuencias codificantes y en las secuencias de aminoácidos que comprenden los dominios VH y VL de los anticuerpos anti-receptor de transferrina no humanos de clase IgG1 con cadena ligera kappa, se generó un anticuerpo anti-receptor de transferrina humanizado correspondiente mediante injerto de CDR y retromutaciones/mutaciones directas basándose en la combinación de armazón de línea germinal humana VH4_3 y VK1_10 para el clon 299.

**Ejemplo 13**

**Método para determinar la afinidad por el receptor de TfR humano/de macaco**

En este ejemplo, se describe el método para la determinación de las afinidades por el receptor de transferrina para la comparación del comportamiento de disociación.

Para todos los análisis se usó el kit Biotin CAPture de GE Healthcare (Instrucción 28-9242-34 AB). En primer lugar se rehidrató el chip acoplándolo en el instrumento BIAcore T200. Después de esto, se dejó en reposo el chip con tampón de ejecución durante toda la noche. Para la preparación de la superficie, se diluyó el reactivo Biotin CAPture a 1:100 en tampón de ejecución (PBS 1x, suplementado con NaCl 0,25 M). Esta solución se inyectó en las celdas de flujo 1 a 4 durante 360 s con un caudal de 2 µl/min. A continuación se condicionó la superficie sensora con tres inyecciones de un minuto de solución de regeneración proporcionada en el kit Biotin CAPture. Esto tiene que efectuarse para el procedimiento de acoplamiento o para la primera vez o después del almacenamiento. Debe inyectarse una solución de receptor de transferrina humano o de macaco mono-biotinilado a 100 nM, respectivamente, en la celda de flujo 2 durante 30 s a un caudal de 10 µl/min. Para la determinación de la afinidad, se aplicaron inyecciones con seis concentraciones

(500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 y 0 nM). Se inyectaron en la celda de flujo “hu-TfR” (por ejemplo, la celda de flujo 2 preparada según se indica anteriormente) con un tiempo de inyección de 180 s (asociación) y un caudal de 10 µl/min. Después de la fase de disociación de 600 s, se regeneró la superficie de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la solución de regeneración proporcionada en el kit Biotin CAPture y se llevó a cabo el ciclo siguiente.

Los datos cinéticos se evaluaron usando el programa informático de evaluación del BIAcore T200. Especialmente, se tomaron en consideración las constantes de velocidad de disociación de las diferentes moléculas de unión al receptor de transferrina humano después de la aplicación del modelo de unión 1:1 de Langmuir.

**Ejemplo 14**

**Clasificación relativa B4000 de la disociación de receptor de transferrina humano/de macaco**

Una placa sensora CAP (proporcionada en el kit Biotin CAPture, serie S n.º 28-9202-34 GE) se montó en un sistema BIAcore B4000, se normalizó y se abordó de manera hidrodinámica, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el primer ciclo, el reactivo CAP (según se proporciona en el kit) se dirigió al punto 1, 2, 4 y 5 con un caudal de 10 µl/min durante 300 s. La captura del receptor de transferrina humano tuvo lugar en el punto 1 (receptor de transferrina humano biotinilado) y el punto 5 (receptor de transferrina de macaco biotinilado) con un caudal de 10 µl/min y un tiempo de contacto de 30 s. Los receptores se diluyeron a una concentración de 50 nM con tampón de ejecución (PBS 1x n.º 28995084, GE Healthcare, suplementado con NaCl 0,25 M). Los anticuerpos se inyectaron en todas las celdas de flujo con un intervalo de concentración de 100 nM, 50 nM, 25 nM y 0 nM durante 180 s a un caudal de 30 µl/min. El tiempo de disociación se configuró a 300 s. La regeneración de todo el complejo del chip CAP se llevó a cabo utilizando la solución de regeneración proporcionada en el kit Biotin CAPture (120 s con un caudal de 10 µl/min). Para controlar la concentración de proteína activa, se llevó a cabo un segundo ciclo en el punto 5 utilizando proteína A biotinilada (n.º P2165-2MG, Sigma) con un caudal de 10 µl/min y un tiempo de contacto de 30 s. El punto 1 se mantuvo vacío en este ciclo de control. Los anticuerpos y la regeneración se manejaron como en el ciclo 1. Los datos cinéticos relevantes se calcularon usando el programa de evaluación del BIAcore B4000. La disociación del receptor de transferrina humano se ha determinado aplicando el ajuste de disociación 1:1.