

ANTICUERPO BIESPECÍFICO CONTRA α -SYN/IGF1R Y USO DEL MISMO

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico contra alfa-sinucleína e IGF1R, a una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de sinucleinopatías (α -sinucleinopatías) que incluye el anticuerpo biespecífico, y a un método para detectar agregados de alfa-sinucleína o proporcionar información para el diagnóstico de alfa-sinucleinopatías que incluye el anticuerpo biespecífico.

TÉCNICA RELACIONADA

La alfa-sinucleína (α -sinucleína, α -syn) se expresa principalmente en los terminales presinápticos de las neuronas, y es un monómero desplegado de manera natural en condiciones normales. La alfa-sinucleína ayuda a regular la liberación de dopamina, que es una clase de neurotransmisor importante que controla el inicio y la detención de los movimientos voluntarios o involuntarios. Particularmente, la función de la alfa-sinucleína es importante con el aumento de actividad sináptica y el envejecimiento, y es un factor importante de neurodegeneración.

Sin embargo, en el estado patológico, la alfa-sinucleína experimenta cambios estructurales a través de la unión e interacción con gotitas, bicapas fosfolipídicas o membranas lipídicas para formar una estructura secundaria plegada o α -helicoidal plegada. Una estructura secundaria de este tipo forma agregados que comprenden moléculas en forma de dímeros, oligómeros y/o fibras.

Se ha sabido que estos agregados de alfa-sinucleína inducen toxicidad a las células, y son el principal componente de un agregado proteico anómalo de cuerpos de Lewy que se hallan en neuronas de enfermedad de Parkinson (PD), demencia por enfermedad de Parkinson (PDD), atrofia multisistémica (MSA), demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y diversas enfermedades. También se sabe que las modificaciones posteriores a la traducción de alfa-sinucleína, tales como fosforilación o ubiquitinación, también están asociadas con la agregación y neurotoxicidad de alfa-sinucleína. Se ha sabido que la alfa-sinucleína destruye las neuronas dopaminérgicas y provoca reacciones inflamatorias en experimentos con animales y experimentos con células, y provoca síntomas motores similares a la enfermedad de Parkinson en animales de experimentación. Además, se ha sabido que la agregación de alfa-sinucleína está relacionada con una etiología de un grupo de enfermedades neurodegenerativas denominadas α -sinucleinopatías, que incluyen enfermedad de Parkinson, demencia por enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica y muchas otras enfermedades neuroaxonales.

Se han propuesto anticuerpos contra alfa-sinucleína o fragmentos de alfa-sinucleína que inducen tales anticuerpos como métodos de inmunoterapia contra la enfermedad por sinucleína. Sin embargo, la penetración del cerebro por parte de los anticuerpos puede estar limitada por la barrera hematoencefálica (BHE).

Además, la deficiencia de transportadores de la BHE altamente específicos ha retrasado el desarrollo de nuevos productos terapéuticos y pruebas diagnósticas para enfermedades que se originan en el cerebro, que incluyen tumores cerebrales y enfermedades neurodegenerativas. Existe claramente una necesidad de un método para suministrar moléculas terapéuticas y diagnósticas a una dosis farmacéuticamente eficaz al cerebro sin alterar la fisiología y la homeostasis de la BHE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

PROBLEMA TÉCNICO

Una realización de la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno contra alfa-sinucleína (α -Syn) y una región de unión a antígeno contra IGF1R, o un método para preparar el anticuerpo.

Otra realización proporciona un polinucleótido que codifica para el anticuerpo, un vector recombinante que comprende el mismo y una célula recombinante que comprende el mismo.

Una realización adicional proporciona una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de alfa-sinucleinopatías, que comprende el anticuerpo biespecífico contra α -Syn e IGF1R y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se proporciona un método para suministrar fármacos usados para el diagnóstico, tratamiento o la prevención de alfa-sinucleinopatías al cerebro, usando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención.

Una realización de la presente invención proporciona un anticuerpo contra IGF1R (receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que puede reconocer específicamente IGF1R sin afectar a la unión del ligando de IGF1R, y realizar transcitosis sin inhibir la transducción de señales a través de IGF1R.

En otra realización, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica para un anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención.

En otra realización, se proporciona una composición para el suministro de una sustancia fisiológicamente activa para su paso a través de la barrera hematoencefálica, que comprende un anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención.

Otra realización de la presente invención es proporcionar un transportador de la barrera hematoencefálica en el que un anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención suministra una sustancia fisiológicamente activa, por ejemplo una sustancia fisiológicamente activa que actúa en un cerebro para su paso a través de la barrera hematoencefálica a través de IGF1R a un cerebro.

En otra realización, se proporciona un suministro de complejo de proteínas para su paso a través de la barrera hematoencefálica a un cerebro, en la que un anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención forma un conjugado con una sustancia fisiológicamente activa, por ejemplo una sustancia fisiológicamente activa que actúa en un cerebro.

En otra realización, se proporciona un método para detectar IGF1R en una muestra biológica, que comprende una etapa de proporcionar un anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención y poner en contacto el anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno con una muestra biológica cuya expresión de IGF1R va a detectarse.

Una realización proporciona un método para suministrar una sustancia fisiológicamente activa usada para el diagnóstico, tratamiento o la prevención de enfermedad cerebral para su paso a través de la BHE hacia el cerebro interno, usando un anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención.

SOLUCIÓN TÉCNICA

A continuación, en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle.

En el presente documento, “anticuerpo” significa una inmunoglobulina completa en cualquier isotipo, o un fragmento de unión a antígeno, que puede competir con un anticuerpo completo por la unión a un antígeno diana. Por ejemplo, incluye anticuerpos quiméricos, humanizados, completos humanos o biespecíficos, o sus fragmentos de unión a antígeno. El anticuerpo es una clase de proteínas de unión a antígeno por sí mismo. Generalmente, el anticuerpo completo comprende al menos dos (2) cadenas pesadas de longitud completa y dos (2) cadenas ligeras de longitud completa, pero en algunos casos, el anticuerpo puede comprender sólo cadenas pesadas. Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoespecíficos que se unen específicamente a una diana y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos triespecíficos) que se unen específicamente a múltiples dianas.

El anticuerpo también incluye un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal, y el anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo aislado que se une específicamente a IGF1R, tal como un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo aislado que se une específicamente a IGF1R, en forma de subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En el presente documento, “cadena ligera” incluye una cadena ligera de longitud completa y sus fragmentos que tienen una secuencia de región variable para proporcionar suficientemente especificidad de unión a un antígeno o epítipo. La cadena ligera de longitud completa comprende un dominio de región variable VL y un dominio de región constante CL. El

dominio de región variable de cadena ligera está presente en un extremo N-terminal de un polipéptido de cadena ligera. Las clases de cadena ligera incluyen las cadenas kappa y lambda.

Tal como se usa en el presente documento, el término “regiones determinantes de complementariedad (CDR)” se refiere a una región que otorga especificidad de unión a antígeno entre las regiones variables de un anticuerpo.

En el presente documento, “cadena pesada” incluye una cadena pesada de longitud completa y sus fragmentos que tienen una secuencia de región variable para proporcionar suficientemente especificidad de unión a un antígeno o epítipo. La cadena pesada de longitud completa comprende un dominio de región variable VH y tres (3) dominios de región constante CH1, CH2 y CH3. El dominio VH está presente en el extremo N-terminal de un polipéptido de cadena pesada y el dominio CH está presente en un extremo carboxilo-terminal, y CH3 se posiciona lo más próximo al extremo C-terminal. La cadena pesada incluye IgG (que incluye los subtipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 y IgG4), IgA (que incluye los subtipos IgA1 y IgA2) y los isotipos de IgM y IgE.

El anticuerpo puede seleccionarse de todos los subtipos de inmunoglobulinas (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, etc.). La forma de IgG del anticuerpo puede ser del subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, por ejemplo subtipo IgG1 o IgG2. El anticuerpo de tipo IgG comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y cada cadena pesada y cadena ligera se combinan a través de enlaces disulfuro para formar dos dímeros de cadena pesada-cadena ligera, y las dos cadena pesada-cadena ligera formadas se unen a través de un enlace disulfuro a la región Fc de la cadena pesada. La forma de IgG del anticuerpo comprende un anticuerpo de una sola diana que selecciona como diana un antígeno, que

incluye sitios de unión a antígeno para el mismo antígeno en ambos constructos de cadena pesada-cadena ligera, o anticuerpo biespecífico que selecciona como diana dos antígenos, que incluye sitios de unión a antígeno para antígenos diferentes en los constructos de cadena pesada-cadena ligera.

Los anticuerpos según la presente invención incluyen anticuerpos biespecíficos, anticuerpos completos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, miméticos de anticuerpo (o anticuerpos sintéticos), fusiones de anticuerpo (o conjugados de anticuerpo), fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos, pero sin limitarse a los mismos. Las estructuras de diversos anticuerpos se dan a conocer adicionalmente a continuación en el presente documento.

En la presente invención, por ejemplo, “variante” de un polipéptido, tal como un fragmento de unión a antígeno, proteína o anticuerpo, es un polipéptido en el que se produce la inserción, delección, adición y/o sustitución en uno o más residuos de aminoácido en comparación con otras secuencias de polipéptido, e incluye polipéptidos de fusión. Por ejemplo, algunos de los anticuerpos incluyen sustituciones de aminoácido conservadoras en uno o más residuos de la secuencia de CDR, cadena pesada o ligera o región variable.

El término “derivado” de un polipéptido en la presente invención significa un polipéptido que está químicamente modificado a través de conjugación con otros restos químicos, y es diferente de variantes de inserción, delección, adición o sustitución.

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse y seleccionarse a partir de ratones transgénicos, por ejemplo aquellos descritos anteriormente, en los que a los ratones se les introduce el gen que codifica para los AcM humanos específicos de antígeno que tienen la especificidad

deseada usando tecnología de hibridoma. Tales anticuerpos pueden clonarse y expresarse usando vectores y células huésped apropiados, o los anticuerpos pueden recogerse a partir de células de hibridoma cultivadas. Además, el anticuerpo puede derivarse a partir de una biblioteca de presentación en fagos. La tecnología de presentación en fagos es un método que imita un tipo de inmunoselección seleccionando un repertorio de anticuerpos en la superficie de un bacteriófago filamentoso y seleccionando la unión de fagos a un antígeno deseado a partir de los mismos. Para una técnica de este tipo, puede hacerse referencia a una realización de la presente solicitud o en el documento WO1999/010494. En una realización, el anticuerpo contra IGF1R humanizado de la presente invención se selecciona a través de un método de presentación en fagos.

El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno puede derivarse a partir de una única fuente o ser un anticuerpo quimérico. El anticuerpo quimérico comprende una parte derivada a partir de dos clases de anticuerpos diferentes, y se describe con más detalle a continuación. El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno puede producirse mediante hibridoma, técnica de ADN recombinante o corte enzimático o químico de un anticuerpo intacto. A menos que se indique de otro modo en el presente documento, el término de anticuerpo incluye anticuerpos que comprenden 2 cadenas pesadas de longitud completa y 2 cadenas ligeras de longitud completa, y sus derivados, variantes, fragmentos y mutantes, y los ejemplos de los mismos son tal como se describen a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, “fragmento de unión a antígeno” incluye una parte de un anticuerpo que puede unirse específicamente a un antígeno, o un polipéptido que incluye la parte. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno incluye una parte de un anticuerpo que contiene residuos de aminoácido que proporciona especificidad y afinidad al anticuerpo al interactuar con el antígeno (por ejemplo, epítopo),

y un polipéptido que incluye la parte. Tales fragmentos comprenden al menos una CDR presente dentro de una cadena ligera o pesada de longitud completa, y en algunas realizaciones comprenden una única cadena pesada y/o ligera, o una porción de las mismas. Este fragmento biológicamente activo puede producirse mediante una técnica de ADN recombinante o puede producirse, por ejemplo, cortando enzimática o químicamente un anticuerpo intacto.

Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional incluye Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpo de dominio y anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv, scFv-Fc etc.), pero sin limitarse a los mismos, y puede derivarse a partir de cualquier mamífero incluyendo ser humano, ratón, rata, camélido o conejo, pero sin limitarse a los mismos. La parte funcional del anticuerpo tal como una o más CDR descritas en el presente documento puede unirse con una proteína secundaria o un compuesto molecular pequeño mediante un enlace covalente y usarse como agente terapéutico diana para una diana específica.

En el presente documento, “anticuerpo monocatenario” es una única cadena de polipéptido de la región de unión a antígeno formada conectando la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera mediante un ligador flexible. Por ejemplo, el anticuerpo monocatenario puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un scFv en el que la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están unidas en forma monocatenaria, un scFv-Fc en el que la región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera y Fc están unidos en forma monocatenaria, y similares. Para el anticuerpo monocatenario, puede hacerse referencia, por ejemplo, a la patente estadounidense n.º 5.260.203.

En el presente documento, “afinidad” o “grado de afinidad” es la fuerza de interacción entre un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno y un

antígeno, y puede determinarse mediante propiedades del antígeno, tales como el tamaño, la forma y/o carga de antígeno, y las secuencias de CDR y/o propiedades fisicoquímicas (propiedades hidrófilas/hidrófobas, propiedad electrostática, etc.) del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Los métodos para determinar la afinidad se conocen en la técnica, y generalmente se indican como constante de disociación (KD), pero sin limitarse a la misma.

En las formas de longitud completa de cadena ligera y cadena pesada, la región variable y la región constante se unen mediante una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos de longitud, y la cadena pesada también incluye una región “D” de aproximadamente 10 o más aminoácidos de longitud. Por ejemplo, puede hacerse referencia a *Fundamental Immunology*, 2ª ed., Cap. 7 (Paul, W., ed.) 1989, Nueva York: Raven Press. Normalmente, las regiones variables del par de cadena ligera y cadena pesada en el anticuerpo pueden formar una región de unión a antígeno.

Una realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno para alfa-sinucleína (α -syn) y una región de unión a antígeno para IGF1R, específicamente un anticuerpo biespecífico contra alfa-sinucleína (α -syn) e IGF1R (a continuación en el presente documento, anticuerpo biespecífico anti- α -Syn/anti-IGF1R). Por consiguiente, el anticuerpo biespecífico según la presente invención puede reconocer y unirse tanto a alfa-sinucleína como a IGF1R como antígenos.

El anticuerpo biespecífico anti- α -Syn/anti-IGF1R según la presente invención incluye anticuerpo anti- α -Syn y un fragmento de unión a antígeno del mismo, y puede reconocer y unirse a alfa-sinucleína, especialmente la región C-terminal de alfa-sinucleína, y por tanto puede usarse para la prevención, el tratamiento y/o diagnóstico de sinucleinopatías que están asociadas con alfa-sinucleína o agregados de alfa-sinucleína.

En el presente documento, “proteína de unión a antígeno bivalente” o “anticuerpo bivalente” comprende dos sitios de unión a antígeno. Dos sitios de unión a antígeno comprendidos en este anticuerpo bivalente pueden tener la misma especificidad de antígeno o pueden ser un anticuerpo biespecífico que se une a antígenos diferentes respectivamente. En el presente documento, “proteína de unión a antígeno multiespecífica” o “anticuerpo multiespecífico” selecciona como diana dos o más de antígenos o epítomos.

En el presente documento, proteína de unión a antígeno o anticuerpo “biespecífico” o “doblemente específico” es una proteína de unión a antígeno o anticuerpo híbrido que tiene 2 sitios de unión a antígeno diferentes. Este anticuerpo biespecífico es una clase de proteína de unión a antígeno multiespecífica o anticuerpo multiespecífico, y puede producirse mediante diversos métodos conocidos, por ejemplo, métodos tales como fusión de hibridoma o unión de fragmento Fab’. Por ejemplo, puede hacerse referencia a Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 1990, 79:315-321; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 1992, 148:1547-1553 y similares. Los dos epítomos que son diferentes entre sí a los que se unen dos sitios de unión a antígeno de la proteína de unión a antígeno o anticuerpo biespecífico pueden posicionarse en la misma proteína diana o en una diferente. En una realización, el anticuerpo de la presente invención puede estar en forma de un anticuerpo biespecífico que comprende adicionalmente la unión a un transportador de suministro para suministrar el anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica. Un método para suministrar fármacos a través de la barrera hematoencefálica incluye el uso de sistemas de suministro tales como transcitosis mediada por receptor, tales como transportador de glucosa, transportador de aminoácidos, receptor de insulina o receptor de transferrina, en una célula.

Según la presente invención, el término “sinucleinopatías” incluye todos los trastornos neurodegenerativos caracterizados por agregados de

sinucleína patológicos. La enfermedad de Parkinson, demencia por enfermedad de Parkinson (PDD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), enfermedad de cuerpos de Lewy, demencia acompañada con cuerpos de Lewy, síndrome de Parkinson con demencia, atrofia multisistémica (MSA), atrofia del sistema nervioso múltiple y neurodegeneración tipo I con acumulación de hierro en el cerebro (NBIA de tipo I) se agrupan colectivamente como sinucleinopatías. Además, también se ha hallado que las agregaciones de alfa-sinucleínas son secundarias en la enfermedad de Alzheimer (Kim *et al.* Alzheimer's Research & Therapy 2014, 6:73).

Las sinucleinopatías son un grupo diverso de trastornos neurodegenerativos que comparten propiedades patológicas comunes. En experimentos neuropáticos, pueden detectarse lesiones distintas detectando la agregación anómala de alfa-sinucleína en las poblaciones seleccionadas de neuronas y oligodendrocitos. La alfa-sinucleína (anteriormente conocida como PARK1 y PARK4) es una proteína compuesta por 140 aminoácidos que se expresa extensamente en la neocorteza, el hipocampo, la circunvolución dentada, la neuroesfera posterior, el cuerpo estriado, el tálamo y el cerebelo. La alfa-sinucleína también se expresa altamente en células hematopoyéticas incluyendo monocitos, tales como células B, células T y células NK, y plaquetas. Aún se desconoce el papel exacto en estas células, pero está asociado con la diferenciación de megacariocitos (precursores de plaquetas).

En el presente documento “una enfermedad asociada con agregados de alfa-sinucleína” es un grupo de enfermedades neurodegenerativas denominadas sinucleinopatías, en las que los agregados de alfa-sinucleína se hallan en lesiones que incluyen neuronas y la glía, y tiene características. Estas enfermedades incluyen enfermedad de Parkinson, demencia por enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, variante de cuerpos de Lewy de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Alzheimer y Parkinson combinada, atrofia multisistémica y muchas otras enfermedades

neuroaxonales, pero no se limitan a las mismas. En una realización, el anticuerpo según la presente invención se usa eficazmente para tratar la enfermedad de Parkinson.

Además, el anticuerpo biespecífico anti- α -Syn/anti-IGF1R de la presente invención incluye un anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, de modo que el anticuerpo anti- α -Syn o fragmento de unión a antígeno del mismo puede penetrar la barrera hematoencefálica para ejercer su acción y prolongar la semivida para mantener una eficacia durante mucho tiempo.

Además, el anticuerpo biespecífico anti- α -Syn/anti-IGF1R de la presente invención se une a IGF1R en la superficie celular sin afectar a la unión del ligando, y tiene las propiedades de no tener efecto sobre la ruta de señalización a través de IGF1R. Dado que no inhibe la unión de IGF1R a su ligando ni la señalización a través de IGF1R, puede usarse como medio de lanzadera para penetrar la barrera hematoencefálica.

Particularmente, el anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención reconoce específicamente IGF1R (receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1) y se une a IGF1R, particularmente IGF1R humano, IGF1R de ratón, IGF1R de rata e IGF1R de mono. Sin embargo, no interfiere con la unión del ligando de IGF1R tal como IGF-1, IGF-2 y/o insulina a IGF1R y no inhibe la transducción de señales a través de IGF1R, y puede usarse para la transcitosis para su paso a través de la BHE. No tiene citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), y por tanto no disminuye los niveles de IGF1R en el cerebro ni siquiera cuando se administra a animales repetidamente, no presentando de ese modo toxicidad.

En particular, el anticuerpo anti-IGF1R de la presente invención se une

a IGF1R ubicado en la superficie de células endoteliales del cerebro que constituyen la BHE y se internaliza en la parte interna de la célula.

Por ejemplo, el anticuerpo anti-IGF1R puede tener una forma de scFv, y puede combinarse con un anticuerpo terapéutico de diversas formas. Por ejemplo, el scFv de un anticuerpo anti-IGF1R puede prepararse en un anticuerpo biespecífico, por ejemplo una forma bivalente de un anticuerpo biespecífico en la que dos scFv se unen al extremo C-terminal del anticuerpo terapéutico, por ejemplo, anticuerpo contra α -syn, o una forma monovalente de un anticuerpo biespecífico en la que un scFv se une al extremo C-terminal del anticuerpo terapéutico. Estos dos anticuerpos biespecíficos pueden internalizarse en las células que expresan IGF1R. El anticuerpo contra IGF1R tiene una alta afinidad de unión por el antígeno en la superficie celular, lo que potencia el efecto de internalización y conduce a la capacidad de paso a través de la BHE. Si un anticuerpo tiene la capacidad de pasar a través de la BHE e interferir con la señalización de IGF1R, puede provocar efectos secundarios. Sin embargo, el anticuerpo de la presente invención se caracteriza tanto por una capacidad de unión adecuada para la lanzadera a través de la BHE como por una propiedad no bloqueante de la señalización de IGF1R.

El anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una propiedad excelente que va a desarrollarse fácilmente. En este aspecto, debe eliminarse la modificación posterior a la traducción, tal como desamidación, que se produce en la región CDR del anticuerpo anti-IGF1R y reduce la estabilidad y eficacia del anticuerpo.

Alternativamente, puede sustituirse al menos uno de los aminoácidos ubicados en ambos lados del sitio de desamidación del anticuerpo, y preferiblemente, puede sustituirse el aminoácido inmediatamente adyacente al lado C-terminal del sitio de desamidación del anticuerpo. Por ejemplo,

sustituyendo A por G ubicada al lado de la Asn ubicada en el sitio de desamidación del anticuerpo o sustituyendo V por S ubicada al lado de la Asn, es posible producir anticuerpos desamidados que tienen una afinidad de unión similar a la del anticuerpo anti-IGF1R parental, y al mismo tiempo tienen una excelente estabilidad y capacidad de penetración de la BHE.

Adicionalmente, cuando se une a una sustancia bioactiva que actúa en el cerebro, el anticuerpo anti-IGF1R de la presente invención puede inducir una capacidad de penetración de la BHE y eficacia mejoradas en comparación con la sustancia bioactiva sola.

El anticuerpo anti-IGF1R según un aspecto de la presente invención puede usarse como un anticuerpo biespecífico que incluye diversos segundos anticuerpos terapéuticos. Mostró que la propiedad de penetración de la BHE es aproximadamente 15 veces mayor que la del anticuerpo único compuesto únicamente por un anticuerpo terapéutico, en el experimento de penetración usando un sistema de BHE *in vitro* derivado a partir de ser humano. El anticuerpo anti-IGF1R puede unirse al segundo anticuerpo en el anticuerpo biespecífico en forma monovalente o bivalente. Por ejemplo, cuando se analiza la cantidad de anticuerpo en sangre y LCR después de una única administración de anticuerpo biespecífico con anticuerpo anti-IGF1R en forma monovalente o forma bivalente a una rata normal, la forma monovalente y la forma bivalente de anticuerpos anti-IGF1R mostró una cantidad aumentada en hasta 5 veces en sangre y una cantidad aumentada en hasta 5 veces en LCR, en comparación con el anticuerpo anti-IGF1R parental (clon 1564). Mostraron una cantidad aumentada en aproximadamente 3 veces en LCR y una cantidad aumentada en aproximadamente 4,5 veces de propiedades de penetración del cerebro, en comparación con el anticuerpo anti-IGF1R parental (clon 1564). Por tanto, se espera que el anticuerpo biespecífico que incluye el anticuerpo anti-IGF1R mejorado mediante el método anterior muestre una cantidad de hasta

aproximadamente 15 veces en LCR y una capacidad de penetración del anticuerpo de aproximadamente 23 veces en el cerebro en comparación con el anticuerpo único compuesto por el segundo anticuerpo terapéutico solo.

Se ha identificado que el anticuerpo anti-IGF1R de la presente invención se une a IGF1R, particularmente IGF1R de mamíferos incluyendo seres humanos, monos, ratas y ratones, y por tanto puede ser útil para el cribado en el desarrollo de fármacos, ensayos clínicos y similares.

El anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno de la presente invención es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce específicamente IGF1R (receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1).

El anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno de la presente invención significa que “se une específicamente” a su diana, tal como un antígeno, cuando la unión se produce a la constante de disociación (KD) de $\leq 10^{-6}$ M. El anticuerpo se une específicamente a la diana con alta afinidad, cuando KD es $\leq 1 \times 10^{-8}$ M o cuando la concentración eficaz 50 (CE₅₀) es de 2 nM o menos. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a IGF1R o IGF1R humano con una KD $\leq 1 \times 10^{-8}$.

Tal como se usa en el presente documento, el término “epítipo” es un determinante antigénico, que se interpreta como que significa una porción del antígeno reconocido por el anticuerpo. Según una realización, el sitio de unión del anticuerpo anti-IGF1R de la presente invención puede ser un dominio extracelular de la proteína IGF1R, por ejemplo, una proteína IGF1R humana (SEQ ID NO: 99). Más específicamente, los sitios de unión del anticuerpo anti-IGF1R de la presente invención, por ejemplo, clon 1564 de anticuerpo para la proteína IGF1R humana, son el sitio de unión 1 que

incluye Y775, P776, F778, R650, S791, L798 y Glu779, el sitio de unión 2 que incluye L641, H808, E809 y L813 y el sitio de unión 3 que incluye V397, D435, W434, Y460 y C488, en la proteína IGF1R human. Por tanto, el epítipo del anticuerpo contra IGF1R de la presente invención puede ser el epítipo conformacional que incluye la totalidad o parte de los tres sitios de unión.

El anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno de la presente invención no previene la unión de ligandos de IGF1R tales como IGF-1, IGF-2 y/o insulina a IGF1R. Específicamente, el anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno no interfiere con la unión del ligando de IGF1R al IGF1R ubicado en la membrana de las células que expresan IGF1R, ni tampoco inhibe la transducción de señales a través de IGF1R ni afecta a la expresión de IGF1R en la superficie celular ventajosamente. Por tanto, el anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede usarse eficazmente para penetrar la barrera hematoencefálica a través de transcitosis. Se ha mostrado que IGF1R tiene un nivel de expresión relativamente alto en el cerebro en comparación con otras dianas de transcitosis que se han usado actualmente y se ha sabido que se expresan en células endoteliales del cerebro para mejorar la capacidad de penetración de la BHE. En una realización de la presente invención, cuando se compara IGF1R con otras dianas que están desarrollándose actualmente con el fin de mejorar la capacidad de penetración de la BHE de anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, receptor de transferrina o receptor de insulina, se ha mostrado que tiene un nivel de expresión relativamente bajo en tejido periférico tal como el hígado, los pulmones o el intestino grueso.

IGF1R es una diana de la transcitosis mediada por receptor (RTM), que puede administrar sustancias útiles a través de la barrera hematoencefálica (BHE) al cerebro. Sin embargo, para que se use como

diana de suministro de fármacos para penetrar la barrera hematoencefálica, es deseable tener una propiedad de unión a IGF1R en la superficie celular sin afectar a la unión del ligando ni a la ruta de señalización a través de IGF1R. Por tanto, el anticuerpo anti-IGF1R y fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención no inhibe la unión de IGF1R a su ligando ni la señalización a través de IGF1R, y por tanto puede usarse como un medio de lanzadera para penetrar la barrera hematoencefálica.

El anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede realizar la transcitosis y puede pasar a través de las células endoteliales del cerebro. Además, el anticuerpo de la presente invención se ubica en el mismo lugar que los vasos sanguíneos del cerebro del ratón, cuando se inyecta en un vaso sanguíneo de ratón. Estos resultados indican que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede usarse eficazmente como transportador de fármacos que atraviesa la barrera hematoencefálica.

Por tanto, el anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno de la presente invención permite que la sustancia bioactiva que actúa en el cerebro pase a través de la barrera hematoencefálica. En la presente invención, la barrera biológica se refiere a células, tejidos, membranas, o a una célula, membrana o estructura que previene el paso, la difusión o transferencia eficaz de la molécula biológica. Estas barreras biológicas incluyen células/tejidos nerviosos, tejido conjuntivo, músculo, membrana o células epiteliales (por ejemplo, de la mucosa o vasculares). Un ejemplo típico es la barrera hematoencefálica.

En la presente invención, el término “barrera hematoencefálica” o BHE es una barrera formada por uniones estrechas en la membrana endotelial capilar del cerebro que existen entre el cerebro y la columna vertebral y su sistema circulatorio circundante. Esta barrera es tan robusta que también

limita el paso de moléculas que tienen un bajo peso molecular de aproximadamente 60 Da al cerebro. La barrera hematoencefálica del cerebro, la barrera de la médula espinal vascular de la columna vertebral y la barrera retiniana vascular de la retina son barreras capilares continuas en el sistema nervioso central, habitualmente denominadas BHE.

En la presente invención, el término “transportador de la barrera hematoencefálica” puede pasar a través de la barrera hematoencefálica y suministrar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención, y por ejemplo, incluye una proteína incluyendo péptido y polipéptido, un ácido nucleico, un anticuerpo o un compuesto molecular pequeño.

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IGF1R, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede ser un polipéptido, una proteína o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por incluir una región determinante de complementariedad de una cadena pesada y una región determinante de complementariedad de una cadena ligera, y se une específicamente a IGF1R.

En los ejemplos específicos, el anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir:

(i) una o más regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 descritas en la tabla 1, o una región variable de cadena pesada que comprende las una o más regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada;

(ii) una o más regiones determinantes de complementariedad de

cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 descritas en la tabla 1, o una región variable de cadena ligera que comprende las una o más regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera;

una combinación de una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena ligera; o

una combinación de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

Adicionalmente, en la región variable de cadena pesada, la región variable de cadena ligera o una combinación de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, la región variable de cadena pesada puede incluir una o más regiones de marco de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4, y la región variable de cadena ligera puede incluir una o más regiones de marco de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4.

En una realización de la presente invención, la eliminación de aminoácidos asociada con la aparición de desamidación en un anticuerpo anti-IGF1R puede reducir el riesgo de degradación del anticuerpo, que no es favorable para el desarrollo de proceso, almacenamiento, etc., sin cambiar la afinidad de unión al ECD de IGF1R como antígeno. En el anticuerpo anti-IGF1R, las posiciones con aminoácidos delecionados pueden ser, por ejemplo, N51D, N51Q o S52V en una L-CDR2 de cadena ligera y N95aK, N95aH, N95aR, N95aD o G95bA en una L-CDR3 de cadena ligera, o N54D, N54Q o G55A en una H-CDR2 de cadena pesada de 1564 (IgG), 1564 (scFv) o 1564-3. La eliminación de desamidación no se limita a los clones descritos anteriormente, sino que puede aplicarse a otros clones según el método de la tabla 14.

Tabla 1

CDR de una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada en anticuerpo anti-IGF1R

ID de clon/ SEQ ID NO	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
1564 (IgG)	1	2	8	20	21	24
1564 (scFv)	1	2	8	20	21	24
1564-3	1	2	8	20	21	24
1564-DM	1	3	8	20	22	25
1564-DMP	1	3	8	20	22	25
VH5-DM	1	4	8	20	22	25
VH5-DMP	1	4	8	20	22	25
F06-DM	1	3	8	20	22	26
F06-DMP	1	3	8	20	22	26
F06 (de2)(StoP)	1	5	8	20	23	27
VH5(de2)(StoP)	1	6	9	20	23	28
VH16(de2)(StoP)	1	7	8	20	23	28
1564(de2)(StoP)	1	5	8	20	23	28
VH2 (scFv)	10	11	19	20	21	24
VH2-3	10	11	19	20	21	24
VH2-DM	10	12	19	20	22	25
VH2-DMP	10	12	19	20	22	25
VH5 (scFv)	1	13	9	20	21	24
VH5-3	1	13	9	20	21	24
VH7 (scFv)	10	14	8	20	21	24
VH7-3	10	14	8	20	21	24
VH7-DM	10	15	8	20	22	25
VH7-DMP	10	15	8	20	22	25
VH9 (scFv)	1	16	8	20	21	24
VH9-3	1	16	8	20	21	24
VH9-DM	1	17	8	20	22	25
VH9-DMP	1	17	8	20	22	25
VH16 (scFv)	1	11	8	20	21	24
VH16-3	1	11	8	20	21	24
VH16-DM	1	12	8	20	22	25
VH16-DMP	1	12	8	20	22	25
VH32 (scFv)	10	18	19	20	21	24

VH32-3	10	18	19	20	21	24
VH32-DM	10	3	19	20	22	25
VH32-DMP	10	3	19	20	22	25
VH35 (scFv)	1	14	9	20	21	24
VH35-3	1	14	9	20	21	24
VH35-DM	1	15	9	20	22	25
VH35-DMP	1	15	9	20	22	25
C04 (scFv)	1	18	8	20	21	29
C04-3	1	18	8	20	21	29
C04-DM	1	3	8	20	22	30
C04-DMP	1	3	8	20	22	30
F06 (scFv)	1	18	8	20	21	31
F06-3	1	18	8	20	21	31

Tabla 2

CDR de una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada en el anticuerpo anti-IGF1R principal

ID de clon	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
F06-DMP	GFTFSS YDMS	AISYDQG NTYYADS VKG	GVLTTLM NWFDY	TGSSSNI GSNDVS	AQSNRPS	GTWAGS LHGYV
SEQ ID NO	1	3	8	20	22	26
F06 (de2)(StoP)	GFTFSS YDMS	AISYDNA NTYYADS VKG	GVLTTLM NWFDY	TGSSSNI GSNDVS	ANVNRPS	GTWAGS LNAYV
SEQ ID NO	1	5	8	20	23	27
VH16(de2)(StoP)	GFTFSS YDMS	AISGSNA NTYYADS VKG	GVLTTLM NWFDY	TGSSSNI GSNDVS	ANVNRPS	GAWDDS LNAYV
SEQ ID NO	1	7	8	20	23	28
1564(de2)(StoP)	GFTFSS YDMS	AISYDNA NTYYADS VKG	GVLTTLM NWFDY	TGSSSNI GSNDVS	ANVNRPS	GAWDDS LNAYV
SEQ ID NO	1	5	8	20	23	28

El anticuerpo anti-IGF1R comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de

cadena pesada comprende una CDR1 de cadena pesada (H-CDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 10, una CDR2 de cadena pesada (H-CDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 7 y SEQ ID NO: 11 a 18 y una CDR3 de cadena pesada (H-CDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 a 9 y SEQ ID NO: 19, y

la región variable de cadena ligera comprende una CDR1 de cadena ligera (L-CDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de cadena ligera (L-CDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 a 23 y una CDR3 de cadena ligera (L-CDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 a 28 y SEQ ID NO: 29 a 31.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera,

la región variable de cadena pesada comprende una CDR1 de cadena pesada (H-CDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada (H-CDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5 a 7 y una CDR3 de cadena pesada (H-CDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 a 9, y

la región variable de cadena ligera comprende una CDR1 de cadena ligera (L-CDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de cadena

ligera (L-CDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y 23 y una CDR3 de cadena ligera (L-CDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 a 28.

La región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-IGF1R según la presente invención puede incluir H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 descritas en la tabla 1, o incluir además H-FR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, H-FR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34, H-FR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y H-FR4 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

La región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-IGF1R según la presente invención puede incluir L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 descritas en la tabla 1, o incluir además L-FR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 37, L-FR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, L-FR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40 y L-FR4 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42.

En las regiones de marco de la cadena pesada y la cadena ligera, la región de marco 1 (FR1) se ubica en el extremo N-terminal de CDR1, la región de marco 2 (FR2) se ubica entre CDR1 y CDR2, la región de marco 3 (FR3) se ubica entre CDR2 y CDR3 y la región de marco 4 (FW4) se ubica en el extremo C-terminal de CDR3.

Específicamente, las secuencias de región de marco en una región variable de cadena pesada de 1564 (IgG) incluyen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, 33, 35 y 36, y aquellas de otros clones

distintos de 1564 (IgG) en la tabla 1 incluyen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, 34, 35 y 36.

Específicamente, las secuencias de región de marco en una región variable de cadena ligera de los anticuerpos anti-IGF1R según la presente invención se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Las secuencias de región de marco en una región variable de cadena ligera de los anticuerpos anti-IGF1R

ID de clon	L-FR1 SEQ ID NO	L-FR2 SEQ ID NO	L-FR3 SEQ ID NO	LFR4 SEQ ID NO
1564 (IgG)	37	38	39	41
1564 (scFv)	37	38	40	42
1564-3	37	38	39	42
1564-DM	37	38	40	42
1564-DMP	37	38	39	42
VH05-DM	37	38	40	42
VH05-DMP	37	38	39	42
F06-DM	37	38	40	42
F06-DMP	37	38	39	42
F06(de2)(StoP)	37	38	39	42
VH5(de2)(StoP)	37	38	39	42
VH16(de2Stop)	37	38	39	42
1564(de2)(StoP)	37	38	39	42
VH2 (scFv)	37	38	40	42
VH2-3	37	38	39	42
VH2-DM	37	38	40	42
VH2-DMP	37	38	39	42
VH5 (scFv)	37	38	40	42
VH5-3	37	38	39	42
VH7 (scFv)	37	38	40	42
VH7-3	37	38	39	42
VH7-DM	37	38	40	42
VH7-DMP	37	38	39	42

VH9 (scFv)	37	38	40	42
VH9-3	37	38	39	42
VH9-DM	37	38	40	42
VH9-DMP	37	38	39	42
VH16 (scFv)	37	38	40	42
VH16-3	37	38	39	42
VH16-DM	37	38	40	42
VH16-DMP	37	38	39	42
VH32 (scFv)	37	38	40	42
VH32-3	37	38	39	42
VH32-DM	37	38	40	42
VH32-DMP	37	38	39	42
VH35 (scFv)	37	38	40	42
VH35-3	37	38	39	42
VH35-DM	37	38	40	42
VH35-DMP	37	38	39	42
C04 (scFv)	37	38	40	42
C04-3	37	38	39	42
C04-DM	37	38	40	42
C04-DMP	37	38	39	42
F06 (scFv)	37	38	40	42
F06-3	37	38	39	42

El anticuerpo anti-IGF1R según la presente invención puede ser un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, y diversas regiones variables de cadena pesada y ligera dadas a conocer en el presente documento se describen a modo de ejemplo en las tablas 4 y 5. Las regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera descritas en las tablas 4 y 5 a continuación pueden combinarse libremente para la producción de diversos tipos de anticuerpos. Cada una de estas regiones variables puede unirse a las regiones constantes de cadena pesada y ligera para formar cada una de las cadenas pesadas y cada una de las cadenas ligeras de un anticuerpo intacto.

Tabla 4
Regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-IGF1R

ID de clon /SEQ ID NO	VH	VL	ID de clon /SEQ ID NO	VH	VL
1564 (IgG)	43	88	VH9 (scFv)	66	111
1564 (scFv)	44	89	VH9-3	67	112
1564-3	45	90	VH9-DM	68	113
1564-DM	46	91	VH9-DMP	69	114
1564-DMP	47	92	VH16 (scFv)	70	115
VH05-DM	48	93	VH16-3	71	116
VH05-DMP	49	94	VH16-DM	72	117
F06-DM	50	95	VH16-DMP	73	118
F06-DMP	51	96	VH32 (scFv)	74	119
F06(de2)(StoP)	52	97	VH32-3	75	120
VH5(de2)(StoP)	53	98	VH32-DM	76	121
VH16(de2Stop)	54	99	VH32-DMP	77	122
1564(de2)(StoP)	55	100	VH35 (scFv)	78	123
VH2 (scFv)	56	101	VH35-3	79	124
VH2-3	57	102	VH35-DM	80	125
VH2-DM	58	103	VH35-DMP	81	126
VH2-DMP	59	104	C04 (scFv)	82	127
VH5 (scFv)	60	105	C04-3	83	128
VH5-3	61	106	C04-DM	84	129
VH7 (scFv)	62	107	C04-DMP	85	130
VH7-3	63	108	F06 (scFv)	86	131
VH7-DM	64	109	F06-3	87	132
VH7-DMP	65	110	**	**	**

Tabla 5
Regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera en los anticuerpos anti-IGF1R principales

ID de clon	VH	VL
F06-DMP	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS AISYDQGNTYYADSVKGRFTISRDN	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGS SSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIYA QSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI

	KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGV LTTLMNWFQDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 51)	SGLRSEDEADYYCGTWAGSLHGYV FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 96)
F06(de2)(St oP)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS AISYDNANTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGV LTTLMNWFQDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 52)	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGS SSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIYA NVNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCGTWAGSLNAYV FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 97)
VH16(de2S top)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS AISGSNANTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGV LTTLMNWFQDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 54)	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGS SSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIYA NVNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCGAWDDSLNAYV FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 99)
1564(de2)(StoP)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS AISYDNANTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGV LTTLMNWFQDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 55)	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGS SSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIYA NVNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCGAWDDSLNAYV FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 100)

La región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención puede incluir una seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 a SEQ ID NO: 87. La región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención puede incluir una seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 88 a 132. Los ejemplos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se describen en las tablas 4 y 5 anteriormente.

El anticuerpo anti-IGF1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce y se une específicamente a al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y775, P776, F778, R650, S791, L798,

Glu779, L641, H808, E809, L813, V397, D435, W434, Y460 y C488 en IGF1R humano que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174. Específicamente, el anticuerpo anti-IGF1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede unirse a al menos uno seleccionado del sitio de unión 1 a sitio de unión 3 de una proteína IGF1R humana que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174. El sitio de unión 1 comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y775, P776, F778, R650, S791, L798 y Glu779, el sitio de unión 2 comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L641, H808, E809 y L813 y el sitio de unión 3 comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V397, D435, W434, Y460 y C488.

Cada una de las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera dadas a conocer en las tablas 4 y 5 pueden usarse como anticuerpos de dominio independientes, pueden combinarse libremente entre sí para formar diversos anticuerpos y se unen en una forma monocaténaria para obtener anticuerpos monocaténarios tales como scFv.

En el presente documento, “anticuerpo de dominio” es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que comprende una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera únicamente. En una realización, dos o más de las regiones VH se unen mediante un enlace covalente, mediante un ligador peptídico, para formar un anticuerpo de dominio bivalente. Dos regiones VH de este anticuerpo de dominio bivalente pueden seleccionar como diana el mismo antígeno o diferentes antígenos.

Los fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos anti-IGF1R de la presente invención pueden ser uno seleccionado del grupo que consiste en scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab', F(ab')₂, minicuerpo y diacuerpo que

incluyen fragmentos de anticuerpo que comprenden una o más regiones determinantes de complementariedad.

En los fragmentos de unión a antígeno, Fab incluye una región variable de cadena ligera, una región variable de cadena pesada, una región constante de cadena ligera y una primera región constante (CH1) de la cadena pesada, y tiene un sitio de unión a antígeno. Fab' tiene una región bisagra en el Fab que contiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio CH1 de cadena pesada. El anticuerpo F(ab')₂ se produce uniendo dos Fab' que forman un enlace disulfuro entre residuos de cisteína de la región bisagra de Fab'.

Fv es un fragmento de anticuerpo mínimo que tiene únicamente una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, e incluye fragmentos variables monocatenarios (scFv) y fragmentos variables bicatenarios (Fv). En el Fv bicatenario, una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera pueden unirse mediante enlaces no covalentes. En el Fv monocatenario, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se unen de manera covalente directamente o mediante un ligador peptídico, o se unen directamente en el extremo C-terminal para formar una estructura similar a un dímero de scFv (di-scFv), tal como un Fv bicatenario. En la presente invención, el Fv monocatenario es una única cadena de polipéptido de una región de unión a antígeno en la que las regiones variables de cadena pesada y ligera se unen directamente o mediante un ligador, y puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en scFv que tiene una única cadena unida con la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, una forma de estructura similar a un dímero de scFv (di-scFv), scFv-Fc en el que la región variable de cadena pesada, la región variable de cadena ligera y Fc se unen como una forma monocatenaria, y similares.

El ligador peptídico puede ser tal como se describió anteriormente, y puede tener, por ejemplo, de 1 a 100, tal como de 2 a 50 aminoácidos de longitud o de 5 a 25 aminoácidos de longitud, y el ligador peptídico puede tener diversas longitudes dentro de un límite que no afecte a la función del anticuerpo. Las clases de aminoácidos incluidas en el ligador peptídico pueden estar compuestas por uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en, por ejemplo, Gly, Ser y Leu, y los ejemplos específicos incluyen residuos de Gly y Ser, o residuos de Leu y Ser. En un ejemplo específico, el ligador peptídico puede ser (G4S)_n, en el que n es un número de repetición de (G4S) representado por un número entero de 1 a 10, tal como de 2 a 5, especialmente 3 ó 4. Un ejemplo del ligador peptídico puede ser un péptido que consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 133 ó 134.

SEQ ID NO 133: GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO 134: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

El Fv monocatenario (scFv) puede producirse fusionando ADN que codifica para un ligador peptídico entre los ADN que codifican para dos polipéptidos de dominio variable (VL y VH). El polipéptido preparado puede formar un monómero o multímeros de unión a antígeno (por ejemplo, dímeros, trímeros o tetrámeros) dependiendo de la longitud del ligador flexible entre los dos dominios variables, con plegamiento. Al combinar polipéptidos que contienen VL y VH diferentes, puede formarse un scFv multimérico que se une a epítomos diferentes.

Los fragmentos de unión a antígeno pueden obtenerse usando enzimas proteolíticas (por ejemplo, digestión por restricción del anticuerpo completo con papaína para obtener Fab y digestión con pepsina para obtener el fragmento F(ab')₂), o usando la tecnología de recombinación genética.

Los anticuerpos monocatenarios dados a conocer en el presente

documento incluyen, pero no se limitan a, scFv que comprenden combinaciones de dominio de regiones variables de cadena pesada y ligera, o combinaciones de dominios variables de cadena ligera y pesada que comprenden CDR.

El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-IGF1R puede unirse con o sin un ligador, tal como un ligador peptídico. Además, las porciones de cadena pesada y ligera en el fragmento de unión a antígeno, tal como la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera en el fragmento scFv, también pueden unirse con o sin un ligador peptídico. El ligador peptídico puede ser tal como se describió anteriormente.

En el anticuerpo biespecífico, el anticuerpo anti-IGF1R y los fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden realizar una función de suministrar un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que selecciona como diana antígenos o epítomos diferentes que se unen al mismo, a través de la barrera hematoencefálica al cerebro. El segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo que ejerce eficacia en el cerebro, pero no está particularmente limitado, puede ser un anticuerpo anti-alfa-sinucleína o un fragmento de unión del mismo según la presente invención.

El anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede compartir una región o secuencia específica con un segundo anticuerpo diferente. Por ejemplo, el anticuerpo anti-IGF1R puede compartir la región constante o la región Fc del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del segundo anticuerpo.

Además, la estructura del anticuerpo biespecífico en la presente invención incluye una forma bivalente de anticuerpo biespecífico, en la que el scFv del anticuerpo anti-IGF1R se une a cada Fc de las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina completa, por ejemplo en los extremos de la

cadena pesada directamente o mediante un ligador, y una forma monovalente de anticuerpo biespecífico, en la que un scFv de un anticuerpo anti-IGF1R unido únicamente a un extremo de las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina completa directamente o mediante un ligador, pero se prefiere un anticuerpo doble monovalente.

Específicamente, en una realización de la presente invención, hay un caso en el que el clon de forma monovalente tiene una semivida mejorada con respecto al clon de forma bivalente, y la estructura del clon de forma monovalente es una forma en la que el anticuerpo de dominio (scFv) contra IGF1R se une únicamente a un extremo de una cadena pesada en la inmunoglobulina intacta mediante un ligador. Específicamente, el anticuerpo es un heterodímero aplicado mediante el método de botón en ojal que incluye dos cadenas pesadas diferentes de la inmunoglobulina intacta, en el que una cadena pesada tiene anticuerpo de dominio (scFv) contra IGF1R unido al extremo C-terminal del mismo y la otra cadena pesada no tiene nada en el extremo C-terminal del mismo.

En el anticuerpo biespecífico, el segundo anticuerpo que se une a un anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo aislado que se une específicamente a IGF1R. El segundo anticuerpo incluye, pero no se limita a, anticuerpos completos, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, miméticos de anticuerpo (o anticuerpos sintéticos), fusiones de anticuerpo (o conjugados de anticuerpo) y fragmentos de los mismos. En el anticuerpo biespecífico, un ejemplo del segundo anticuerpo que se une al anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser el anticuerpo anti-syn o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención.

A continuación, en el presente documento, la presente invención se

refiere a un anticuerpo anti-syn y a un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La alfa-sinucleína que puede ser reconocida por el anticuerpo proporcionado en el presente documento puede seleccionarse de las alfa-sinucleínas de mamífero de alfa-sinucleína humana, alfa-sinucleína de mono (por ejemplo alfa-sinucleína de *Rhesus*), alfa-sinucleína de ratón, alfa-sinucleína de rata y similares. Por ejemplo, la alfa-sinucleína humana puede ser alfa-sinucleína (NCBI ID: NP_000336), pero sin limitarse a la misma. A menos que se indique de otro modo en el presente documento, la alfa-sinucleína puede referirse a alfa-sinucleína humana, y los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno proporcionados en el presente documento tienen una propiedad de unión específica no sólo a alfa-sinucleína humana, sino también a alfa-sinucleína de mono (por ejemplo, *Rhesus*), alfa-sinucleína de rata y/o alfa-sinucleína de ratón.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a la región C-terminal de alfa-sinucleína, específicamente la región C-terminal que incluye el péptido compuesto por al menos 11 ó 12 aminoácidos consecutivos que incluyen los residuos 110 a 120 o los residuos 111 a 122 en SEQ ID NO: 173 de alfa-sinucleína humana. Se ha confirmado que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede reconocer la región de reconocimiento de antígeno y unirse al agregado de alfa-sinucleína con una alta afinidad de unión.

En el presente documento, “que se une específicamente a la proteína alfa-sinucleína o al agregado de alfa-sinucleína” significa que la afinidad de unión a la proteína alfa-sinucleína o al agregado de alfa-sinucleína es relativamente alta en comparación con otros antígenos, y por ejemplo, la afinidad puede ser de $0,1 \times 10^{-10}$ M a 2×10^{-10} M, o de $0,05 \times 10^{-10}$ M a $0,3 \times 10^{-9}$ M para los agregados de alfa-sinucleína, específicamente fibrillas,

protofibrillas y oligómeros de amiloide, particularmente fibrillas de amiloide, tal como se mide mediante análisis Octet o análisis de SPR, pero sin limitarse a los mismos.

Los anticuerpos contra alfa-sinucleína humanizadas que incluyen la cadena ligera y cadena pesada según una realización de la presente invención, por ejemplo, Hu11F11 (ver.2) y Hu11F11_ABL2-4, muestran una alta actividad para fomentar la captación fagocítica en comparación con los anticuerpos contra alfa-sinucleína quiméricos. En comparación con el anticuerpo contra alfa-sinucleína quimérico, Hu11F11 (ver.1), Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.3), Hu11F11 (ver.4) y ABL2-4 muestran alta actividad de inhibición de la unión de la fibrilla a la membrana de la célula nerviosa en comparación con el anticuerpo contra alfa-sinucleína quimérico. Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.4) y ABL2-4 tienen alta actividad de inhibición de la propagación de alfa-sinucleína secretada a partir de las células que sobreexpresan alfa-sinucleína a otras células nerviosas en comparación con el anticuerpo contra alfa-sinucleína quimérico, y muestran afinidad de unión al agregado de alfa-sinucleína, por ejemplo, que tiene una actividad similar o superior al anticuerpo contra alfa-sinucleína quimérico en un ensayo basado en células.

El anticuerpo contra alfa-sinucleína según la presente invención puede inhibir la función de agregados de alfa-sinucleína secretados de la célula nerviosa en el sistema nervioso de un sujeto para su transferencia a otras células normales en un espacio extracelular e infectar las células nerviosas (inhibir la transmisión de agregados de célula a célula) y tener la capacidad de fomentar la acción fagocítica de la microglía con respecto a los agregados de alfa-sinucleína en el espacio extracelular. Los agregados de alfa-sinucleína se propagan de una célula a otra célula como priones, y la alfa-sinucleína, especialmente los agregados de alfa-sinucleína, se extienden a lo largo de todo el cerebro, dando como resultado sinucleinopatías en células

normales. Por tanto, los agregados de alfa-sinucleína son tóxicos para las neuronas del cerebro y se sabe bien que provocan la muerte de las neuronas del cerebro (neurodegeneración) y neuroinflamación. Por consiguiente, a medida que los agregados de alfa-sinucleína se extienden a diversas partes del cerebro, aumentan la muerte de células cerebrales y las reacciones de neuroinflamación, y dan como resultado la aparición de la muerte de células cerebrales y los deterioros cognitivos y conductuales resultantes que se hallan con la progresión de sinucleinopatías tales como la enfermedad de Parkinson.

Por consiguiente, el anticuerpo contra alfa-sinucleína de la presente invención puede prevenir el fenómeno de extensión de agregados de alfa-sinucleína a diversas regiones del cerebro inhibiendo la transmisión de alfa-sinucleína o agregado de alfa-sinucleína entre las células nerviosas y reducir el nivel de agregados de alfa-sinucleína, que es una causa importante de sinucleinopatías, reduciendo o eliminando los propios agregados de alfa-sinucleína en la región extracelular de las células nerviosas del sistema nervioso del sujeto con el fomento de la fagocitosis de la microglía, dando como resultado la reducción de la muerte de células nerviosas del cerebro y la reacción neuroinflamatoria y, además, se espera que mejore, alivie o prevenga los síntomas y el avance de sinucleinopatías tales como la enfermedad de Parkinson.

Además, el anticuerpo contra alfa-sinucleína según la presente invención tiene excelentes actividades en la realización de ambas dos funciones de (i) inhibición de la transmisión de la alfa-sinucleína o del agregado de alfa-sinucleína entre las células nerviosas (véase el resultado del ensayo basado en células dado a conocer en el presente documento) y (ii) reducción del nivel de agregados de alfa-sinucleína en el sistema nervioso del cerebro a través de la fagocitosis fomentada de las células de la microglía. En particular, puesto que los anticuerpos contra alfa-sinucleína encontrados

actualmente en ensayos clínicos o publicados en la bibliografía científica tienen una de las dos actividades (i) y (ii), esto sugiere que el anticuerpo contra alfa-sinucleína de la presente invención tiene una ventaja en la prevención o el tratamiento superior de sinucleinopatías con respecto a los anticuerpos contra alfa-sinucleína conocidos. Por tanto, el anticuerpo contra alfa-sinucleína según la presente invención tiene eficacias más excelentes de reducción y eliminación de agregados de alfa-sinucleína e inhibición de la acción de agregados de alfa-sinucleína como etiología, y por tanto es más eficaz para las sinucleinopatías o una enfermedad sintomática relacionada con las mismas (por ejemplo, trastorno por deterioro cognitivo).

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno según la presente invención que tienen una alta afinidad por los agregados de alfa-sinucleína pueden reducir la formación de agregados de alfa-sinucleína, reduciendo de ese modo la concentración de agregados en el cerebro. Además, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la presente invención con una alta afinidad por los agregados de alfa-sinucleína puede reducir la formación de agregados de alfa-sinucleína fuera del sistema nervioso central y, finalmente, cambiar el estado de equilibrio entre las formas de alfa-sinucleína unidas a la BHE, conllevando de ese modo al efecto de reducción de la concentración de agregados de alfa-sinucleína dentro del sistema nervioso central.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la presente invención puede inhibir la formación de agregados retirando monómeros, o eliminando tanto monómeros como agregados.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención que se unen específicamente a proteínas alfa-sinucleína o agregados de alfa-sinucleína pueden no ser un producto que se produce de manera natural (puede ser un producto que se produce de manera no natural,

por ejemplo, mediante síntesis química o un método recombinante). Las técnicas de recombinación se conocen bien en la técnica.

El anticuerpo anti-alfa-sinucleína o el anticuerpo biespecífico que incluye el anticuerpo anti-alfa-sinucleína puede usarse para la prevención o el tratamiento de α -sinucleinopatía, y la α -sinucleinopatía puede incluir enfermedad de Parkinson (PD), demencia por enfermedad de Parkinson (PDD), demencia con cuerpos de Lewy, (DLB), variante de cuerpos de Lewy de enfermedad de Alzheimer (LBV)), enfermedad de Alzheimer y Parkinson combinada o atrofia multisistémica (MSA), pero sin limitarse a las mismas.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a alfa-sinucleína o a un agregado de la misma según la presente invención incluye una región variable de cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad de CDRH1, CDRH2 y CDRH3; y una región variable de cadena ligera que comprende una región determinante de complementariedad de CDRL1, CDRL2 y CDRL3.

En una realización, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender las siguientes secuencias de CDR:

- una CDR1 de cadena pesada (H-CDR1) que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135,

- una CDR2 de cadena pesada (H-CDR2) que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 o SEQ ID NO: 137,

- una CDR3 de cadena pesada (H-CDR3) que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138,

- una CDR1 de cadena ligera (L-CDR1) que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139,

- una CDR2 de cadena ligera (L-CDR2) que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140, y

una CDR3 de cadena ligera (L-CDR3) que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141.

Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 a CDR3 de cadena pesada y las secuencias de aminoácidos de la CDR1 a CDR3 de cadena ligera se resumen en las tablas 6 y 7. En las cadenas ligeras de Hu11F11-VLv3 4c y Hu11F11-VL4 mostradas en la tabla 7, las secuencias de aminoácidos de CDR1 a CDR3 de cadena ligera son las mismas, pero las secuencias de región de marco son diferentes.

Tabla 6

Secuencias de aminoácidos de CDR1 a CDR3 de cadena pesada de anticuerpos anti- α -syn

Clon	SEQ ID NO	VH_CDR1	SEQ ID NO	VH_CDR2	SEQ ID NO	VH_CDR3
Hu11F11-VH-v1	135	GFTFSDFY ME	136	ASRNKANDYTTEYSA SVKG	138	DAHGKPFA Y
Hu11F11-VH-v2	135	GFTFSDFY ME	136	ASRNKANDYTTEYSA SVKG	138	DAHGKPFA Y
Hu11F11-VH-v3	135	GFTFSDFY ME	136	ASRNKANDYTTEYSA SVKG	138	DAHGKPFA Y
Hu11F11-VH-v4	135	GFTFSDFY ME	136	ASRNKANDYTTEYSA SVKG	138	DAHGKPFA Y
Hu11F11-VH2	135	GFTFSDFY ME	137	AIRNKANDYTTEYAAS VKG	138	DAHGKPFA Y

Tabla 7
 Secuencias de aminoácidos de CDR1 a CDR3 de cadena ligera de anticuerpos anti- α -syn

Clon	SEQ ID NO	VL_CDR1	SEQ ID NO	VL_CDR2	SEQ ID NO	VL_CDR3
Hu11F11-VLv3 4c	139	KSSQSLLYSSNQKNYL A	140	WASTRE S	141	QQYYSPW T
Hu11F11-VL4	139	KSSQSLLYSSNQKNYL A	140	WASTRE S	141	QQYYSPW T

Las diversas regiones variables de cadena pesada y ligera dadas a conocer en el presente documento pueden unirse a las regiones constantes de cadena pesada y ligera para formar cada una de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo intacto. Además, cada una de las secuencias de cadena pesada y ligera generadas de este modo también pueden combinarse para formar una estructura de anticuerpo completo.

Por ejemplo, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 142 a SEQ ID NO: 146 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147 a SEQ ID NO: 148, y las secuencias a modo de ejemplo de las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera se muestran en la tabla 8 a continuación.

Tabla 8
Región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera de anticuerpo anti- α -syn

Clon	Cadena	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
Hu11F11-VH-v1	VH	142	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYME WVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRF TISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAHGKP FAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v2	VH	143	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYME WVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRF TVSRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAHGKP FAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v3	VH	144	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYME WVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRF TISRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAHGKP FAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v4	VH	145	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYME WVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRF TVSRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDAHGKP FAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH2	VH	146	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYME WVRQAPGKGLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRF TISRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAHGKP FAYWGQGTLVTVSS
Hu11F11-VLv3 4c	VL	147	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFTLTISSVKAEDVAVYYCQQYYSPWTFGG GTKLEIK
Hu11F11-VL4	VL	148	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSPWTFGQ GTKVEIK

Además, los anticuerpos a modo de ejemplo a través de una combinación de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una

realización se describen en la tabla 9.

Tabla 9

Anticuerpos anti- α -syn a modo de ejemplo de la presente invención

ID de clon	Región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera de cada clon	SEQ ID NO
hu11F11(ver.1)	Hu11F11-VH-v1	142
	Hu11F11-VLv3 4c	147
hu11F11(ver.2)	Hu11F11-VH-v2	143
	Hu11F11-VLv3 4c	147
hu11F11(ver.3)	Hu11F11-VH-v3	144
	Hu11F11-VLv3 4c	147
hu11F11(ver.4)	Hu11F11-VH-v4	145
	Hu11F11-VLv3 4c	147
hu11F11(H2L4)	Hu11F11-VH2	146
	Hu11F11-VL4	148

En otra realización, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína puede consistir únicamente en la cadena ligera o cadena pesada descritas anteriormente. En otra realización, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína puede consistir únicamente en la región variable de cadena ligera o la región variable de cadena pesada.

En una realización adicional, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera descritas en la tabla 8 anteriormente pueden combinarse para formar diversos anticuerpos, o pueden unirse en una forma monocaténaria para formar un anticuerpo monocaténario tal como scFv.

Los anticuerpos dados a conocer en el presente documento pueden compartir determinadas regiones o secuencias con otros anticuerpos dados a conocer en el presente documento. En una realización, puede compartirse la región constante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En otras realizaciones, pueden compartir una región Fc.

Puede incluir una cadena pesada que incluye la región variable de cadena pesada y una cadena ligera que incluye la región variable de cadena ligera. Específicamente, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera pueden unirse a la región constante de cadena pesada y a la región constante de cadena ligera, y las secuencias de cadena pesada y cadena ligera también pueden combinarse para formar una estructura de anticuerpo intacto.

Las secuencias de región constante que pueden combinarse con la región variable según la presente invención son a modo de ejemplo, y la región constante puede seleccionarse de manera apropiada de la región constante de cadena pesada y la región constante de cadena ligera de una inmunoglobulina (por ejemplo, inmunoglobulina humana). Por ejemplo, la región constante de cadena pesada puede ser una región constante de cadena pesada de IgG1, una región constante de cadena pesada de IgG3 o una región constante de cadena pesada de IgG4, y la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o una región constante lambda de cadena ligera, pero no se limita a las mismas.

Como anticuerpo a modo de ejemplo que comprende una región variable y una región constante de un anticuerpo anti- α -Syn o fragmento de unión a antígeno según una realización, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína del clon hu11F11 (ver.2) puede ser un anticuerpo que incluye una cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y una cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150.

El anticuerpo anti-alfa-sinucleína según la presente invención puede usarse solo como un anticuerpo terapéutico, pero puede usarse como un anticuerpo biespecífico en combinación con otros anticuerpos que pueden suministrarlo al cerebro atravesando la barrera hematoencefálica. Un ejemplo de un anticuerpo que puede suministrarlo al cerebro atravesando la barrera

hematoencefálica puede ser un anticuerpo anti-IGF1R y un fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo anti-IGF1R y fragmento de unión a antígeno del mismo, que puede formar un anticuerpo biespecífico, puede incluir todos los anticuerpos anti-IGF1R y fragmentos de unión a antígeno de los mismos anteriormente descritos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-IGF1R puede ser un anticuerpo completo, o el fragmento de unión a antígeno puede ser uno seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo de dominio, scFv, (scFv)₂, scFvFc, Fab, Fab' y F(ab')₂.

El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-IGF1R puede unirse con o sin un ligador, por ejemplo, un ligador peptídico. Además, la región de cadena pesada y la región de cadena ligera en el fragmento de unión a antígeno, tal como la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera en el fragmento scFv, pueden unirse con o sin un ligador peptídico. El ligador peptídico puede ser tal como se describió anteriormente.

El anticuerpo anti-alfa-sinucleína o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención puede usarse en la preparación de combinaciones de cadena pesada para la producción de anticuerpos biespecíficos, y los ejemplos de cadenas pesadas de los anticuerpos anti-alfa-sinucleína usados para producir una combinación de cadena pesada para el anticuerpo biespecífico están asociadas con un anticuerpo anti-alfa-sinucleína de hu11F11 (ver.2), e incluyen hu11F11 (ver.2) (IGG) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y hu11F11 (ver.2)(IGG) CON MUTACIÓN DE OJAL EN FC que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151.

Los ejemplos de cadenas pesadas de anticuerpos anti-alfa-sinucleína usados en la preparación de combinaciones de cadena pesada para la producción de anticuerpos biespecíficos, que incluyen el anticuerpo anti-alfa-

sinucleína de hu11F11 (ver.2) anteriormente descrito, se muestran en la tabla 10 a continuación, y las secuencias de cadena pesada se muestran en SEQ ID NO: 151 a SEQ ID NO: 172, pero sin limitarse a las mismas. Además, la tabla 10 a continuación muestra los componentes específicos del clon de anticuerpo biespecífico en el que se combinan la combinación de cadena pesada que usa la cadena pesada del anticuerpo anti-alfa-sinucleína y la cadena ligera. Los anticuerpos biespecíficos presentados a continuación se describen como ejemplos, y la construcción resulta clara a partir de la descripción de la combinación de cadena pesada del anticuerpo biespecífico, incluso si no se indica mediante SEQ ID NO. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo se muestran específicamente en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10

ID de clon de anticuerpo biespecífico	Cadena ligera de anticuerpo biespecífico	Combinación de cadena pesada de anticuerpo biespecífico	SEQ ID	Descripción de los componentes en la combinación de cadena pesada de anticuerpo biespecífico
hu11F11(ver.2)-1564 (scFv) monovalente	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-1564-2 monovalente (HC 1, -ojal)	158	hu11F11(ver.2 (IGG) CON MUTACIÓN DE OJAL EN FC,
				(G4S)3,
				1564 (scFv) VL,
				(G4S)4,
				1564 (scFv) VH
		hu11F11(ver.2)-1564 monovalente (HC 2, -botón)	152	hu11F11(ver.2 (IGG) CON MUTACIÓN DE BOTÓN
hu11F11(ver.2)-VH5 bivalente	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH5 bivalente (HC)	*	hu11F11(ver.2 (IGG),
				(G4S)3,
				VH5 VL,
				(G4S)4,
				VH5 VH
hu11F11(ver.2)-	Hu11F11-	hu11F11(ver.2)-	*	hu11F11(ver.2 (IGG),

VH16 bivalente	VLv3 4c	VH16 bivalente (HC)		(G4S)3,
				VH16 VL,
				(G4S)4,
				VH16 VH
hu11F11(ver.2)-F06-DM monovalente	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M4 28L)-F06-DM monovalente (HC 1, -ojal)	165	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, MUTACIÓN DE OJAL,
				(G4S)3,
				F06-DMP VL,
				(G4S)4,
				F06-DMP VH
		hu11F11(ver.2)(M4 28L)-F06 monovalente (HC 2, -botón)	155	hu11F11(ver.2 (IGG), MUTACIÓN M428L, MUTACIÓN DE BOTÓN
hu11F11(ver.2)-F06-DMP monovalente	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2) - F06-DMP monovalente (HC 1, -ojal)	*	hu11F11(ver.2 (IGG), MUTACIÓN DE OJAL,
				(G4S)3,
				F06-DMP VL,
				(G4S)4,
				F06-DMP VH
		hu11F11(ver.2) - F06 monovalente (HC 2, -botón)	*	hu11F11(ver.2 (IGG), MUTACIÓN DE BOTÓN
hu11F11(ver.2)(M428L)-F06-DMP monovalente	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M4 28L)-F06-DMP monovalente (HC 1, -ojal)	164	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, MUTACIÓN DE OJAL,
				(G4S)3,
				F06-DMP VL,
				(G4S)4,
				F06-DMP VH
		hu11F11(ver.2)(M4 28L)-F06 monovalente (HC 2, -botón)	155	hu11F11(ver.2 (IGG), MUTACIÓN M428L, MUTACIÓN DE BOTÓN
hu11F11(ver.2)(M428L)-F06-DM	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M4 28L)-F06-DM	165	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, MUTACIÓN

monovalente		monovalente (HC 1, -ojal)		DE OJAL,
				(G4S)3,
				F06-DM VL,
				(G4S)4,
				F06-DM VH
		hu11F11(ver.2)(M4 28L)-F06 monovalente, desamidado, S->P (HC 2, -botón)	155	hu11F11(ver.2 (IGG), MUTACIÓN M428L, MUTACIÓN DE BOTÓN
hu11F11(ver.2)-F06(de2)(StoP) monovalente	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-F06(de2)(StoP)- (monovalente, desamidado, S->P (HC 1, -ojal)	166	hu11F11(ver.2) (IGG) MUTACIÓN DE OJAL
				(G4S)3
				F06(de2)(StoP) VL
				(G4S)4
				F06(de2)(StoP) VH
		hu11F11(ver.2)-F06(de2)(StoP)- (de2) monovalente, desamidado, S->P (HC 2, -botón)	152	hu11F11(ver.2 (IGG), MUTACIÓN DE BOTÓN
hu11F11(ver.2)-VH5(de2)(StoP) bivalente	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH5(de2)(StoP) desamidado, S->P bivalente(HC)	167	hu11F11(ver.2 (IGG)
				(G4S)3,
				VH5(de2)(StoP)VL
				(G4S)4
				VH5(de2)(StoP)VH
hu11F11(ver.2)-VH16(de2)(StoP) bivalente	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH16(de2)(StoP) desamidado, S->P bivalente(HC)	168	hu11F11(ver.2 (IGG)
				(G4S)3,
				VH16(de2)(StoP)VL
				(G4S)4
				VH16(de2)(StoP)VH
hu11F11(ver.2)(M428L)-F06(de2)(StoP)	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-F06(de2)(StoP)-	169	hu11F11(ver.2) (IGG) M428L, MUTACIÓN DE OJAL

monovalente		(monovalente, desamidado, S->P (HC 1, -ojal)		(G4S)3
				F06(de2)(StoP) VL
				(G4S)4
				F06(de2)(StoP) VH
		hu11F11(ver.2)(M4 28L)- F06(de2)(StoP)- (de2) monovalente, desamidado, S->P (HC 2, -botón)	155	hu11F11(ver.2 (IGG), MUTACIÓN M428L, MUTACIÓN DE BOTÓN
hu11F11(ver.2)- F06(de2)(StoP) bivalente	Hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(ver.2)- F06(de2)(StoP) desamidado, S->P bivalente(HC)	*	hu11F11(ver.2) (IGG)
				(G4S)3,
				F06(de2)(StoP)VL
				(G4S)4
				F06(de2)(StoP)VH
hu11F11(ver.2)(M 428L)- F06(de2)(StoP) bivalente	Hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M4 28L)- F06(de2)(StoP) desamidado, S->P bivalente(HC)	*	hu11F11(ver.2 (IGG) M428L mutado
				(G4S)3,
				F06(de2)(StoP)VL
				(G4S)4
				F06(de2)(StoP)VH
hu11F11(ver.2)- 1564 (de2)(StoP) monovalente	Hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(ver.2)- 1564(de2)(StoP)- monovalente, desamidado, S->P (HC1,-ojal)	*	hu11F11(ver.2) (IGG) MUTACIÓN DE OJAL
				(G4S)3
				1564(de2)(StoP) VL
				(G4S)4
				1564(de2)(StoP) VH
		hu11F11(ver.2)- 1564(de2)(StoP)- (de2) monovalente, desamidado, S->P (HC2,-botón)	*	hu11F11(ver.2) (IGG) CON MUTACIÓN DE BOTÓN
hu11F11(ver.2)(M	Hu11F11-	hu11F11(ver.2)(M4	170	hu11F11(ver.2 (IGG)

428L)- VH5(de2)(StoP) bivalente	VLv3 4c	28L)- VH5(de2)(StoP) desamidado, S->P bivalente(HC)		mutación M428L
				(G4S)3,
				VH5(de2)(StoP)VL
				(G4S)4
hu11F11(ver.2)(M 428L)- VH16(de2)(StoP) bivalente	Hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M4 28L)- VH16(de2)(StoP) desamidado, S->P bivalente(HC)	171	hu11F11(ver.2 (IGG) mutación M428L
				(G4S)3,
				VH16(de2)(StoP)VL
				(G4S)4
hu11F11(ver.2)(M 428L)- 1564(de2)(StoP) monovalente	Hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M4 28L)- 1564(de2)(StoP)- monovalente, desamidado, S->P (HC 1, -ojal)	172	hu11F11(ver.2) (IGG) M428L, MUTACIÓN DE OJAL
				(G4S)3
				1564(de2)(StoP) VL
				(G4S)4
hu11F11(ver.2)(M 428L)- 1564(de2)(StoP) monovalente	Hu11F11- VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M4 28L)- 1564(de2)(StoP)- (de2) monovalente, desamidado, S->P (HC 2, -botón)	155	1564(de2)(StoP) VH
				Hu11F11(ver2)(M428 L)-botón

La composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad por alfa-sinucleína, que comprende el anticuerpo contra alfa-sinucleína o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo biespecífico que comprende el mismo, según la presente invención comprende un anticuerpo contra alfa-sinucleína o anticuerpos biespecíficos en una cantidad farmacéuticamente eficaz.

Tal como se usa en el presente documento, “tratamiento” puede hacer

referencia a cualquier acción relacionada con el alivio o la eliminación de una enfermedad o un síntoma, o estado patológico, que incluye reducir, aliviar, mitigar o eliminar una enfermedad o un síntoma de enfermedad, haciendo que el síntoma de enfermedad o estado patológico sea más tolerable, ralentizando la tasa de agravamiento del síntoma de enfermedad o estado patológico, etc. El término “sujeto” o “paciente” incluye ser humano o paciente humano.

Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo y un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la presente invención incluye un método para tratar a un paciente asociado con alfa-sinucleína administrando la composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas usadas para la administración *in vivo* se proporcionan normalmente como preparaciones estériles. Una vez formulada la composición farmacéutica, puede almacenarse la composición farmacéutica en viales estériles como disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal o polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para usar, o en una forma que se reconstituye inmediatamente antes de la administración (por ejemplo, liofilizada).

La vía de administración de la composición farmacéutica puede ser un método conocido, por ejemplo, por vía oral; inyección mediante las vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intraventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional, y sistemas de liberación sostenida; o pueden usarse dispositivos implantados. En determinadas realizaciones, la composición puede administrarse de manera continua mediante inyección en bolo, o mediante infusión o un dispositivo de implantación.

El anticuerpo contra alfa-sinucleína o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo biespecífico que comprende el mismo, según la presente invención descrito en el presente documento puede usarse con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar o monitorizar enfermedades y/o síntomas asociados con alfa-sinucleína. Para el uso diagnóstico, los anticuerpos pueden marcarse normalmente con un marcador detectable.

Efectos de la invención

El anticuerpo preparado en una realización de la presente invención se une específicamente a IGF1R con una afinidad de unión optimizada para la transcitosis endotelial cerebral, y es útil para el suministro de anticuerpos para el tratamiento de enfermedades cerebrales degenerativas y cáncer cerebral, que tienen una eficacia terapéutica limitada debido a la baja capacidad de penetración de la barrera hematoencefálica. En particular, el anticuerpo dado a conocer en la presente invención no afecta a la unión de ligandos tales como IGF-1, IGF-2 e insulina, como su homólogo a IGF1R, y no inhibe la transducción de señales a través de IGF1R, y por tanto tiene utilidad en relación con la penetración de la barrera hematoencefálica. El anticuerpo dado a conocer en el presente documento puede eliminar o fomentar eficazmente la degradación de agregados de alfa-sinucleína, y puede inhibir la transferencia intercelular de alfa-sinucleína, de modo que puede usarse de manera útil en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de agregados de alfa-sinucleína. El anticuerpo contra alfa-sinucleína o el anticuerpo biespecífico que comprende el mismo según la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica para prevenir o tratar una α -sinucleinopatía.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un resultado de ELISA para medir la afinidad de

anticuerpo quimérico anti- α -syn y anticuerpo 11F11 humanizado preparados en un ejemplo de la presente invención.

Las figuras 2a a 2c son resultados de análisis de BIAcore de la afinidad y especificidad de unión preferidas de anticuerpo quimérico anti- α -syn y anticuerpo 11F11 humanizado preparados en un ejemplo de la presente invención por agregados de alfa-sinucleína.

Las figuras 3a y 3b son datos de unión del anticuerpo anti-IGF1R preparado en un ejemplo de la presente invención a la proteína IGF1R.

Las figuras 4a, 4b y 4c son datos de unión del anticuerpo anti-IGF1R preparado en un ejemplo de la presente invención a líneas celulares que expresan IGF1R.

La figura 5a, 5b y 5c muestran datos de la internalización del anticuerpo anti-IGF1R preparado en un ejemplo de la presente invención en líneas celulares que expresan IGF1R y su destino en la célula.

Las figuras 6a, 6b y 6c son datos que muestran que el anticuerpo anti-IGF1R preparado en un ejemplo de la presente invención no afecta a la señalización de IGF1R inducida por IGF1 o insulina.

Las figuras 7a, 7b, 7c, 7d, 7e y 7f muestran que el anticuerpo anti-IGF1R y el anticuerpo biespecífico que incluye el anticuerpo anti-IGF1R y un anticuerpo terapéutico penetran la BHE *in vivo* mejor que el anticuerpo terapéutico solo.

La figura 8 es un resultado que muestra la posición de desamidación del anticuerpo anti-IGF1R.

La figura 9 es un resultado de mapeo de epítipo de un anticuerpo anti-IGF1R.

Las figuras 10a y 10b son resultados de ELISA para medir la capacidad de unión del anticuerpo biespecífico preparado en un ejemplo de la presente invención a cada antígeno.

La figura 10c y 10d son resultados de ELISA para comparar las afinidades de unión del anticuerpo quimérico y del anticuerpo humanizado a cada antígeno.

La figura 10e es un resultado de evaluación de la actividad de fagocitosis de la microglía sobre el anticuerpo biespecífico preparado en un ejemplo de la presente invención.

Las figuras 11a a 11e son resultados de evaluación de la eficacia del anticuerpo biespecífico preparado en un ejemplo de la presente invención en comparación con un anticuerpo monoespecífico en un modelo animal de ratón.

La figura 12 es un resultado que muestra la semivida aumentada y la mejora en la penetración de la BHE realizando modificación por ingeniería de Fc sobre el anticuerpo biespecífico preparado en un ejemplo de la presente invención.

La figura 13 es un resultado de evaluación de capacidad para reducir α -syn en un modelo animal de ratón con respecto al anticuerpo biespecífico preparado en un ejemplo de la presente invención.

Las figuras 14a, 14b y 14c son resultados de ELISA para realizar un análisis comparativo de la capacidad de unión a antígeno de los anticuerpos

anti-IGF1R desamidados preparados en los ejemplos de la presente invención y los anticuerpos de control, respectivamente.

Las figuras 15a a 15c son resultados de análisis de FACS de la capacidad de unión específica para IGF1R del anticuerpo biespecífico desamidado preparado en un ejemplo de la presente invención.

La figura 16 es un resultado de un análisis comparativo de la capacidad de penetración de la BHE *in vivo* del anticuerpo biespecífico desamidado preparado en los ejemplos de la presente invención y los anticuerpos de control.

La figura 17 es un resultado de un análisis comparativo de la capacidad de penetración de la BHE *in vivo* del anticuerpo biespecífico desamidado preparado en los ejemplos de la presente invención y los anticuerpos de control.

Descripción detallada

La presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos, pero no se pretende que el alcance de la presente invención se limite a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpo contra alfa-sinucleína de ratón

1-1: Inmunización y producción de hibridoma

Se colocaron monómero de alfa-sinucleína de longitud completa (140 residuos) o escindido con 21 residuos C-terminales (119 residuos) en una termomezcladora a 37°C, se agregaron con agitación a 1050 rpm durante 14

días y se sonicaron. Cada uno de los 140 residuos y 119 residuos de la fibrilla de α -syn a 1 mg/ml se mezcló con el adyuvante a una razón de 1:1 (vol:vol). La secuencia de aminoácidos de alfa-sinucleína de *Homo sapiens* se muestra en SEQ ID NO: 173.

Luego, se inyectaron por vía subcutánea 200 μ l de la mezcla preparada a ratones hembra BALB/c de 5 a 7 semanas de edad. Después de 2 semanas, se inyectaron adicionalmente por vía subcutánea 200 μ l de la mezcla preparada para el refuerzo de anticuerpo. Después de una semana de refuerzo, se extrajo sangre y se realizó titulación de inmunización mediante el método de ELISA usando el antígeno administrado. Posteriormente, se realizó un tercer refuerzo mediante inyección subcutánea de antígeno solo.

Se extirpó el bazo del ratón inmunizado y se obtuvieron los esplenocitos a partir del bazo. Se suspendieron los esplenocitos en medio de hibridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) complementado con FBS al 10%. Para preparar el hibridoma, se mezclaron los esplenocitos y SP2/O-Ag14 de una célula de mieloma murino en un medio de hibridoma-SFM sin suero, y seguido de centrifugación para retirar el medio. Luego, se añadió PEG al sedimento celular obtenido y se incubó a 37°C durante 1 minuto para inducir la fusión celular.

1-2: Clonación de células individuales y purificación de anticuerpos

Después de 2 semanas en la fusión, se confirmó la fusión con células B de ratón que producen anticuerpos con un método de ELISA usando el antígeno administrado al ratón y un medio de cultivo celular. Luego, se llevó a cabo la clonación de células individuales usando un hibridoma para seleccionar 16 hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Se

obtuvieron los clones de 9B11 (IgG1 kappa) usando el agregado de α -Syn de longitud completa (140 residuos) como antígeno y se obtuvieron los clones de 3A9 y 11F11 (IgG2b kappa e IgG2b kappa, respectivamente) usando agregados de α -Syn con 21 residuos C-terminales escindidos como antígenos.

Con el fin de purificar el anticuerpo, se cultivó cada hibridoma en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10%. Para la producción de anticuerpos, se reemplazó el medio de cultivo por medio SFM libre de suero y se cultivó durante aproximadamente 4 días. Se separó el sobrenadante de cultivo celular, se centrifugó, se filtró con un filtro de 0,22 μ m y se purificó con una columna de proteína G para el tipo IgG1 y una columna de proteína A para el resto de anticuerpos.

1-3: Determinación de la secuencia de región variable

Se determinaron las secuencias de región variable y de CDR haciendo referencia a la divulgación de Ahn *et al*, Mol. Cells 2004, 18 (2): 237-241. Se cultivaron los hibridomas y se centrifugaron para aislar únicamente las células. Se aisló el ARN a partir del hibridoma aislado mediante la adición de un triazol y se usó para sintetizar ADNc como molde.

Ejemplo 2. Preparación de anticuerpos (quiméricos) anti-alfa-sinucleína

2-1: Clonación y expresión de anticuerpos

Usando las secuencias de nucleótidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo obtenido después de la humanización, se sintetizó gBlocks (m.biotech) de un fragmento de nucleótido corto y se clonó en el vector de cultivo celular animal (pcDNA3.4).

Se sintetizó gBlocks incluyendo una secuencia superpuesta de aproximadamente 20 pb antes y después de la región variable, y la parte del vector pcDNA3.4 excluyendo la región variable se amplificó mediante PCR y se clonó mediante el método de ensamblaje de Gibson.

Con el fin de transfectar y expresar el anticuerpo clonado, se usó el vector preparado para maxi-prep (Qiagen) para obtener una gran cantidad de ADN plasmídico, y luego se introdujo en células de la siguiente manera. El día antes de la transfección, la concentración de células ExpiCHO™ (Gibco, n.º de cat. A29127) se ajustó a una concentración de 3×10^6 a 4×10^6 células viables/ml en medio de expresión de ExpiCHO™ (Gibco, n.º de cat. A29100-01) y se cultivó en el 8% de CO₂, a 37°C y 120 rpm durante 1 día. El día de la transfección de ADN, las células que se hicieron crecer hasta de 7×10^6 a 10×10^6 células viables/ml y tenían tasas de supervivencia del 95% o más se prepararon mediante dilución usando medio nuevo hasta 6×10^6 células viables/ml.

Con el fin de transfectar las células parentales, se preparó complejo de ExpiFectamine™ CHO y ADN plasmídico usando el kit de transfección de ExpiFectamine™ CHO (Gibco, n.º de cat. A29129). Se prepararon los reactivos, ADN y ExpiFectamine™ CHO, a concentraciones apropiadas dispensando con medio OptiPRO™ SFM® frío (Gibco, n.º de cat. 12309019), se inocularon respectivamente y se mezclaron para su reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos. El producto se inoculó en células parentales y se cultivó después de la transfección. El día después de la transfección, se inocularon el potenciador y el alimento incluidos en el kit de transfección ExpiFectamine™ CHO en las células transfectadas, y después de 5 días, se inoculó adicionalmente el alimento, seguido de incubación durante 10 días en el 8% de CO₂, 37°C y 120 rpm para producir las células transfectadas.

Con el fin de obtener la disolución de cultivo, se transfirió el medio de

cultivo a un frasco de centrífuga para la centrifugación y se centrifugó a 4°C y 6500 rpm durante 30 minutos, seguido de filtración con un filtro que tenía un tamaño de 0,2 µm para obtener un medio de cultivo con sólidos suspendidos retirados, y luego se usó el medio de cultivo para la purificación posterior.

2-2: Purificación y secuenciación de anticuerpo

Se purificó el cultivo usando HiTrap MabSelectSure (GE Healthcare, 11-0034-94). Después de equilibrar con un tampón de equilibrado (Tris-HCl 50 mM pH 7,2, NaCl 100 mM), se cargó el cultivo recuperado en una columna. Cuando se completó la carga, se lavó el medio con citrato de sodio 50 mM (pH 5,0), y luego se eluyó usando citrato de sodio 50 mM (pH 3,4). Se añadió Tris-HCl 1 M pH 9,0 al eluido para neutralizar hasta pH 6,0. Luego, se sometió el eluido a intercambio de tampón y se concentró con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4) y se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

Cuando se requirió purificación adicional, se realizó una segunda purificación basándose en el tamaño de la muestra eluida haciendo pasar el primer producto purificado a través de tampón PBS 1X en la columna HiLoad 26/600 superdex 200. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo purificado se analizó mediante espectrometría de masas, y se confirmó que era congruente con la región variable del anticuerpo monoclonal derivado de ratón.

La porción de región variable de la estructura principal del isotipo de IgG1 humana se reemplazó por las regiones variables de los anticuerpos 3A9, 9B11 y 11F11 identificados mediante el método anterior para preparar un anticuerpo IgG1 humana quimérico. Entre los anticuerpos quiméricos obtenidos, especialmente el anticuerpo Ch11F11 es un anticuerpo en forma de IgG y comprende una combinación de la secuencia de región variable de

cadena pesada de SEQ ID NO: 175 (ch11F11-VH). La parte en negrita en la tabla 11 corresponde a las regiones CDR.

Tabla 11

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
ch11F11-VH	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSG GFTFSDFYME WVRQ PPGKRLEWIA ASRNKANDYTTEYSASVKGR FIVSRDTSQSI LYLQMNALRAEDTAIYYCARD DAHGKPFAY WGQGTLVTVSA	175
ch11F11-VL	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSC KSSQSLLYSSNQKNYLA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVKAEDLAVYYC QQYYSPWT FGGGTKLEIK	176

Ejemplo 3: Producción de anticuerpo humanizado

3-1: Preparación de biblioteca de fagos

Se construyó una minibiblioteca en la que se introdujo una secuencia derivada de ratón o ser humano en cada residuo de CDR, al tiempo que se unía la región de marco humana a los residuos de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo quimérico.

Las células competentes de la minibiblioteca producida se inocularon en medio 2X YT [17 g de triptona (CONDA, 1612,00), 10 g de extracto de levadura (CONDA, 1702,00) y 5 g de NaCl (Sigma, S7653)] que contenía 34 µg/ml de cloranfenicol (Sigma, C0857), glucosa al 2% (Sigma, G5400) y MgCl₂ 5 mM (Sigma, C0857) a 30°C durante 3 horas hasta tener una DO600 de 0,5 a 0,7. Luego, se infectaron las células con un fago auxiliar y se cultivaron en medio 2X YT que contenía 34 µg/ml de cloranfenicol, MgCl₂ 5 mM, 70 µg/ml de kanamicina (Sigma, K1876) e IPTG 1 mM (ELPISBIO, IPTG025) a 30°C durante 6 horas para inducir el empaquetamiento de fagos. Se centrifugó la disolución de cultivo a 4500 rpm a 4°C durante 15 minutos.

Se le añadió al sobrenadante PEG 6000 al 4% (Fluka, 81253) y NaCl al 3% (Sigma, S7653) y se incubó durante 1 hora sobre hielo. Se centrifugó el producto a 8000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y luego, se suspendió el sedimento en PBS y se centrifugó de nuevo a 4°C y 12.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sobrenadante que contenía la biblioteca de fagos. Se almacenó el sobrenadante obtenido a 4°C hasta su uso posterior.

3-2: Selección (*panning*) por presentación en fagos

Con el fin de seleccionar anticuerpos que se unen preferentemente a agregados de alfa-sinucleína con respecto a los monómeros, se realizó la selección usando los agregados de alfa-sinucleína de longitud completa preparados en el ejemplo 1, y se realizaron un total de tres selecciones de la siguiente manera.

Se añadió albúmina sérica bovina (BSA) a las células a una concentración del 3% en un tubo de ensayo a 4°C durante la noche, añadiendo 10 µg/ml de monómeros y agregados de alfa-sinucleína recombinantes al PBS en un inmunotubo (maxisorp 444202), se añadió la disolución al tubo de ensayo y se protegió la superficie de tales monómeros y agregados de alfa-sinucleína que no se adsorbieron. Después de vaciar el tubo de ensayo, se colocó la biblioteca de fagos de anticuerpo de 10^{12} UFC dispersada en disolución de BSA al 3% en el inmunotubo en el que se adsorbieron los monómeros y agregados de alfa-sinucleína y se hicieron reaccionar durante 1 hora (selección negativa). Luego, se recuperaron los fagos que no se unieron a los monómeros y agregados de alfa-sinucleína y se hicieron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente en los monómeros y agregados de alfa-sinucleína que se adsorbieron. Se usó solución salina tamponada con fosfato (Tween 20 al 0,05%) para recuperar la disolución de trietilamina 100 µM, que se recuperó usando una disolución de PBS-T. Las *E. coli* a 37°C durante 1 hora, y las *E. coli* infectadas se

sembraron en estrías en el medio de agar 2X YT y se cultivaron a 37°C durante la noche (pH 7,4), se infectaron con ER2537. Al siguiente día, las *E. coli* cultivadas se suspendieron en 4 ml de disolución de cultivo 2X YT que contenía carbenicilina y se añadió glicerol al 15%, y se almacenó una parte a -80° y se usó el resto para preparar fagos para los siguientes experimentos. Al repetir este procedimiento 3 tandas en total, se amplificó y concentró el conjunto de fagos específicos del antígeno de alfa-sinucleína. A medida que avanzaba la tanda de selección, aumentó el número de lavados usando PBS-T para amplificar y concentrar el fago específico del antígeno.

3-3: Cribado de clones individuales

Para clasificar los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al agregado de alfa-sinucleína a partir del conjunto de fagos obtenido a través de la selección, se realizó el experimento de la siguiente manera.

Para aislar monoclonos a partir del conjunto concentrado, después de sembrar el conjunto de fagos en estrías en un medio de agar LB-tetraciclina/carbenicilina y cultivar, se obtuvo una única colonia. Luego, después de inocular monoclonos en una placa de 96 pocillos profundos en la que se colocaron 400 μl de medio 2X YT-tetraciclina/carbenicilina por pocillo y hacerlos crecer durante la noche, se colocaron 10 μl de disolución de cultivo en una nueva placa de 96 pocillos profundos en la que se colocaron 390 μl de medio 2X YT-tetraciclina/carbenicilina y se cultivó a 37°C durante 4 horas. Se colocó IPTG 1 mM en la disolución de cultivo y se cultivó a 30°C durante la noche. Se centrifugó la disolución de cultivo cultivada durante la noche para extraer un sobrenadante.

Luego, se seleccionaron los clones que expresan un monoclon-scFv soluble que se une a un agregado de alfa-sinucleína usando el método de

ELISA. Específicamente, se colocó el anticuerpo 7B7 seleccionado en el ejemplo 1-1 en una placa de 96 pocillos (*Nunc-Immuno Plates, NUNC, EE.UU.*) y se recubrió a 4°C durante la noche. Se añadió BSA al 3% a cada pocillo en una cantidad de 200 µl, seguido de bloqueo a 37°C durante 2 horas. Luego, se cargaron el monómero y los agregados de alfa-sinucleína a una concentración de 100 ng/pocillo, se hicieron reaccionar a 37°C durante 2 horas y se lavaron cinco veces con 300 µl de PBS-T. Se mezcló el sobrenadante de clon individual preparado con BSA al 3% en una razón en volumen de 1:1 (vol:vol) y se cargaron 100 µl de la disolución en la placa unida al agregado y al monómero, seguido de reacción a 37°C durante 2 horas. Se lavaron las células cinco veces con 300 µl de PBS-T y se incubaron a 37°C durante 1 hora con un anticuerpo anti-HA conjugado con HRP, seguido de lavado con PBS-T cinco veces. Después de añadir 100 µl de TMB (tetrametilbencidina, Sigma, T0440), se detuvo la reacción mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 1 N para medir la absorbancia a 450 nm. Los clones con una absorbancia de 0,5 o superior se consideraron como reacción positiva mediante unión y se excluyeron los clones que se unen a BSA de manera inespecífica.

Los residuos de CDR de los clones hallados en la biblioteca se analizan *in silico* en paralelo, y se seleccionaron los clones que provocan graves problemas con la unión a la región de marco o los clones que no tienen epítipo de célula T, epítipo de célula B ni epítipo de CMHII en las partes de región de marco distintas de la CDR.

Después de eso, las regiones variables de los clones seleccionados se sustituyeron por la región variable de la cadena principal del isotipo de IgG1 humana para preparar un anticuerpo humanizado con estructura principal de IgG1. Específicamente, hu11F11 (H2L4) es un anticuerpo de tipo IgG de una combinación de Hu11F11-VH2 de SEQ ID NO: 146 y Hu11F11-VL4 de SEQ ID NO: 148; Hu11F11_(ver. 1) es un anticuerpo de tipo IgG de una

combinación de Hu11F11-VH-v1 de SEQ ID NO: 142 y Hu11F11-VLv3 4c de SEQ ID NO: 147; Hu11F11_(ver.3) es un anticuerpo de tipo IgG de una combinación de Hu11F11-VH-v3 de SEQ ID NO: 144 y Hu11F11-VLv3 4c de SEQ ID NO: 147; y Hu11F11 (ver.4) es un anticuerpo de tipo IgG de una combinación de Hu11F11-VH-v4 de SEQ ID NO: 145 y Hu11F11-VLv3 4c de SEQ ID NO: 147.

Ejemplo 4. Ensayo ELISA de anticuerpo anti-alfa-sinucleína

Se realizó ELISA tipo sándwich para analizar cuantitativamente la afinidad de unión del anticuerpo quimérico (Ch11F11) obtenido en el ejemplo 2 y los anticuerpos humanizados (Hu11F11) obtenidos en el ejemplo 3.

Específicamente, cada anticuerpo se diluyó 1/10 hasta una concentración de 0,04 a 400 nM y se recubrió sobre una placa de 96 pocillos, y se trataron 2000 ng/ml de agregados en cada pocillo. Después de lavar con PBS 1X, se trataron con anticuerpo de captura conjugado con biotina y estreptavidina conjugada con HRP, seguido de reacción con TMB como sustrato, y se midió la absorbancia de los mismos. Los resultados se muestran en la figura 7.

Tal como se muestra en la figura 1, se confirmó que los anticuerpos humanizados según la presente invención, particularmente el anticuerpo humanizado derivado de 11F11 quimérico (anticuerpo 11F11 humanizado), mostraron una afinidad de unión equivalente a la del clon de 11F11 quimérico. Los anticuerpos humanizados, especialmente las variantes derivadas de 11F11 tales como hu11F11(ver.1) que tiene una combinación de Hu11F11-VH-v1 y Hu11F11-VLv3 4c, hu11F11(ver.2) que tiene una combinación de Hu11F11-VH-v2 y Hu11F11-VLv3 4c, hu11F11(ver.3) que tiene una combinación de Hu11F11-VH-v3 y Hu11F11-VLv3 4c, y hu11F11(ver.4) que tiene una combinación de Hu11F11-VH-v4 y Hu11F11-VLv3 4c, mostraron

una afinidad de unión equivalente al clon de 11F11 quimérico. Su valores de CE_{50} fueron de 11,5 a 15,1 nM, que fue similar a 12,5 nM de CE_{50} en el 11F11 quimérico.

Ejemplo 5. Análisis de BIAcore usando anticuerpo anti-alfa-sinucleína

Muchos anticuerpos quiméricos producidos en el ejemplo 2 y los anticuerpos humanizados en el ejemplo 3 se analizaron cuantitativamente usando las afinidades de unión de muchos anticuerpos humanizados.

El instrumento usado fue T200 (GE Healthcare, n.º de serie: 1565888). Se usa proteína A como chip (GE Healthcare, n.º de cat. 29-1275-56). Glicina-HCl 10 mM pH 1,5 (GE Healthcare, n.º de cat. BR-1003-54) fue el tampón de regeneración. El tampón de ejecución, dilución de analito y el tampón de dilución de muestra fueron HBS-EP. Los anticuerpos preparados en el ejemplo 2 y el ejemplo 3 se diluyeron con $1 \times$ HBS-EP (GE Healthcare, n.º de cat. BR-1006-69), y el monómero de alfa-sinucleína (1 mg/ml) y la proteína de fibrilla (3 mg/ml) se diluyeron en serie por duplicado y se analizaron a 6 concentraciones (0, 0,39, 1,56, 6,25, 25, 100 nM) incluyendo 0 nM en total. Para la captura, el monómero fue para una UR de 800 (teórico) y una fibrilla fue para una UR de 100 (teórico). La fase de captura se realizó a un tiempo de contacto de 60 segundos, una velocidad de flujo de 30 μ l/min y un periodo de estabilización de 180 segundos. La fase de asociación se realizó a un tiempo de asociación de 120 segundos y la velocidad de flujo fue de 30 μ l/min. La fase de disociación se realizó a un tiempo de disociación de 360 segundos y la velocidad de flujo de 30 μ l/min. La fase de regeneración se realizó dos veces a un tiempo de regeneración de 240 segundos (primaria) y 60 segundos (secundaria) y una velocidad de flujo de 30 μ l/min. El ajuste se llevó a cabo usando el modelo de unión 1:1, y el software de evaluación fue el software de evaluación BIAcore T200 (GE Healthcare).

Los resultados del análisis se muestran en las figuras 2a a 2c y la siguiente tabla.

Tabla 12

ID de clon	K _D (nM)
Ch11F11	0,02472
Hu11F11(ver.2)	0,0596
Hu11F11(ver.3)	0,0316
Hu11F11(ver.4)	0,0204

Como resultado, los anticuerpos humanizados en la expresión, especialmente los anticuerpos humanizados de anticuerpo quimérico 11F11, tales como hu11F11 (ver.2), hu11F11 (ver.3) y hu11F11 (ver.4), mostraron el mismo valor de KD que el anticuerpo quimérico 11F11. La unión de anticuerpos humanizados tuvo una KD de 0,02 a 0,06 X 10⁻⁹ M, y una baja KD de 0,02 X 10⁻⁹ M del anticuerpo quimérico, que fue una alta afinidad para cuerpos flotantes.

Ejemplo 6. Producción de anticuerpo contra IGF1R (scFv)

6-1: Preparación de anticuerpo contra IGF1R (scFv)

Los anticuerpos monoclonales se prepararon usando la técnica de presentación/selección en fagos. Específicamente, los antígenos usados en la presentación/selección en fagos y otros análisis se usaron como las siguientes proteínas. El péptido que consiste en los residuos 31 a 932 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, en el que la secuencia señal se escindió a partir del dominio extracelular de IGF1R humano, se etiquetó con histidina en el extremo C-terminal y se usó para este ejemplo (R&D Systems, EE.UU., 391-GR). Se usaron IGF1R de mono (Consejo Nacional de Investigación de Canadá), IGF1R de ratón (R&D Systems, 6630-GR/CF) e

IGF1R de rata (Consejo Nacional de Investigación de Canadá) con etiqueta His en el extremo C-terminal como antígeno para someter a prueba la reactividad cruzada interespecífica.

Se inocularon 1×10^{10} de las células de biblioteca de scFv (fragmento variable monocatenario) con diversidad que se derivaron de ser humano (preparadas mediante SHIM Hyunbo en la Universidad de Mujeres Ehwa) en medio 2X YT [17 g de triptona (CONDA, 1612,00), 10 g de extracto de levadura (CONDA, 1702,00) y 5 g de NaCl (Sigma, S7653)] que contenía 34 µg/ml de cloranfenicol (Sigma, C0857), glucosa al 2% (Sigma, G5400) y MgCl_2 5 mM (Sigma, C0857) a 30°C durante 3 horas hasta tener una DO600 de 0,5 a 0,7. Luego, se infectaron las células con un fago auxiliar y se cultivaron en medio 2X YT que contenía 34 µg/ml de cloranfenicol, MgCl_2 5 mM, 70 µg/ml de kanamicina (Sigma, K1876) e IPTG 1 mM (ELPISBIO, IPTG025) a 30°C durante 16 horas para inducir el empaquetamiento de fagos. Posteriormente, se centrifugó la disolución de cultivo a 4500 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se le añadió al sobrenadante PEG 6000 al 4% (Fluka, 81253) y NaCl al 3% (Sigma, S7653) y se incubó durante 1 hora sobre hielo. Se centrifugó el producto a 8000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y luego, se suspendió el sedimento en PBS y se centrifugó de nuevo a 4°C y 12.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sobrenadante que contenía la biblioteca de fagos. Se almacenó el sobrenadante obtenido a 4°C hasta su uso posterior.

6-2: Selección por presentación en fagos

Con el fin de cribar el anticuerpo contra IGF1R humano, se realizó la selección en tres tandas según lo siguiente. La biblioteca de fagos fue una biblioteca de scFv humanos sintéticos y el procedimiento de selección por presentación en fagos y el resultado se mostraron en la tabla 13.

Tabla 13

Etapa		Selección		
		Tanda 1	Tanda 2	Tanda 3
Antígeno		ECD de IGF1R (biotinilado)	ECD de IGF1R (biotinilado)	Célula MCF-7
Método de recubrimiento		Inmovilización indirecta	Inmovilización indirecta	–
Entrada		$7,0 \times 10^{12}$	$6,0 \times 10^{12}$	$5,0 \times 10^{12}$
Salida	IGF1R o MCF-7	$4,9 \times 10^8$	$3,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Lavado	PBS-T**	5 veces	10 veces	10 veces
	PBS	2 veces	2 veces	2 veces

Específicamente, se añadió 1 ml de proteína IGF1R humana recombinante a una concentración de 5 ug/ml (R&D Systems, EE.UU., 391-GR o Sino Biological Life Technologies, EE.UU., 10164-H08H-50R) a un inmunotubo (maxisorp 444202) y se recubrió sobre la superficie del inmunotubo a 4°C durante 16 horas. Luego, se retiró el sobrenadante y se incubó con la adición de PBS que contenía BSA al 3% a 37°C durante 1 hora para bloquear la unión inespecífica mediante la unión de BSA a la superficie en la que no está unido IGF1R. Después de retirar el sobrenadante, se colocó la biblioteca de fagos preparada en el ejemplo 11-1 mezclada con disolución de BSA al 1,5% en el inmunotubo y se hizo reaccionar a 37°C durante 1 hora para permitir la unión del fago específico de IGF1R al antígeno. Luego, se lavó el producto con disolución de PBS-T (solución salina tamponada con fosfato-Tween 20 al 0,05%) para retirar el fago que se unió de manera inespecífica y se recogió el fago que se unió a IGF1R con disolución de trietilamina 100 mM.

Se neutralizó el fago recogido con disolución de tampón Tris 1 M (pH 7,4) y se transfectó con *E. coli* K12 ER2738 a 37°C durante 1 hora, y se extendieron las *E. coli* infectadas sobre medio de agar LB que contenía tetraciclina y carbenicilina, y se cultivaron a 37°C durante la noche. Al siguiente día, se suspendieron las *E. coli* cultivadas en 5 ml de medio SB

(supercaldo) que contenía tetraciclina y carbenicilina y se le añadió glicerol al 50% al mismo volumen. Se almacenó una parte a -80°C, y se suspendieron 50 μ l de producto en 40 ml de medio SB (supercaldo) que contenía tetraciclina y carbenicilina, se le añadieron 10^{12} UFP de fago auxiliar VCSM13 y se cultivaron con agitación a 37°C durante 1 hora. Luego, se le añadió a la disolución de cultivo kanamicina y se cultivó a 30°C durante aproximadamente 16 horas, para cultivar únicamente *E. coli* infectadas con el fago auxiliar.

Al siguiente día, después de centrifugar la disolución de cultivo, se extrajo el sobrenadante y se añadió a un tampón que contenía PEG 8000 al 4% y cloruro de sodio (NaCl) al 3%, se hizo reaccionar a 4°C durante aproximadamente 1 hora, y se precipitó y centrifugó el fago. Después de retirar el sobrenadante, se resuspendió el conjunto de fagos precipitados en tampón PBS que contenía BSA al 1%, y se usó para la siguiente tanda de selección. A medida que avanzaba la tanda de selección, se aumentó el número de lavados usando PBS-T para amplificar y concentrar el fago específico del antígeno.

6-3: Cribado de clones individuales

Se seleccionaron los clones celulares que mostraron afinidad de unión al ECD (dominio extracelular) de IGF1R humano y MCF-7 que expresan IGF1R.

Específicamente, para seleccionar los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a IGF1R a partir del conjunto de fagos obtenido en el ejemplo 11-2, se realizó el siguiente experimento.

Con el fin de separar los monoclonos a partir del conjunto concentrado, se extendió el conjunto de fagos obtenido en el medio de agar LB-

tetraciclina/carbenicilina y se cultivó para obtener una única colonia. Después de inocular estas colonias en una placa de 96 pocillos profundos e incubar durante la noche, volvieron a inocularse 10 ul de la disolución de cultivo en la placa de 96 pocillos profundos y se incubó a 37°C durante aproximadamente 4 horas de la misma manera para obtener una DO apropiada (de 0,5 a 0,7). Después de añadir fago auxiliar a 20 MOI a la disolución de cultivo, se hizo reaccionar la mezcla a 37°C durante 1 hora. Después de eso, se añadió kanamicina al medio de cultivo y se cultivó durante la noche a 30°C. Al siguiente día, se centrifugó el medio de cultivo y se extrajo el sobrenadante para realizar ELISA para seleccionar fagos específicos de IGF1R (Steinberger. Rader y Barbas III. 2000. Phage display vectors. En: Phage Display Laboratory Manual. 1ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY. EE.UU. Pp. 11.9-11.12).

Se añadieron 100 ng de IGF1R recombinante a cada pocillo en una placa de ELISA, y se hizo reaccionar a 4°C durante aproximadamente 15 horas para recubrir el antígeno sobre la placa. Para prevenir la unión inespecífica, se añadió tampón PBS que contenía BSA al 3% a 200 ul por pocillo, y luego se hizo reaccionar a 37°C durante aproximadamente 1 hora. Se descartó el sobrenadante.

Se colocaron en cada pocillo 100 ul de la disolución que contenía el fago monoclonal preparado, se hizo reaccionar a 37°C durante 1 hora y se lavó 3 veces con 300 ul de PBS-T. Para detectar el fago unido al antígeno de IGF1R, se diluyó 1:5000 anticuerpo anti-HA conjugado con HRP en tampón PBS que contenía BSA al 3% y se hizo reaccionar a 37°C durante 1 hora. Después de lavar 3 veces con 300 ul de PBS-T, se añadieron 100 ul de TMB (tetrametilbencidina, Sigma, T0440) para desarrollar color y se añadieron 50 ul de H₂SO₄ 1 N para extinguir la reacción. Al medir la absorbancia a 450 nm, los clones con alta absorbancia en comparación con el grupo de control de BSA se seleccionaron como clones de anticuerpo específicos del antígeno.

Se seleccionó el clon 1564 mediante doble cribado.

Ejemplo 7: Producción de variante de afinidad de anticuerpo anti-IGF1R

Los anticuerpos se optimizaron llevando a cabo variación de afinidad por los clones seleccionados evaluando la capacidad de unión de ligando y la capacidad de penetración de la BHE. En el primer ensayo, se prepararon cebadores de mezcla manual NNS para aleatorizar la CDR2 de cadena pesada y la CDR3 de cadena ligera basándose en el gen de scFv de 1564 y de scFv de 1564 amplificado que contiene la secuencia de aleatorización usando la técnica de PCR. Los productos génicos amplificados se insertaron en el vector pComb3x para elaborar una forma de biblioteca adecuada para la presentación en fagos, y pudieron seleccionarse varios clones de scFv que se unen a IGF1R a través de la selección de biblioteca y el cribado mediante ELISA. Para los clones seleccionados, se identificaron las secuencias de aminoácidos de la región variable a través de secuenciación génica.

En el segundo ensayo, se construyeron dos minibibliotecas para las cadenas pesada y ligera que introdujeron una retromutación de la línea germinal en CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Finalmente se obtuvieron los clones seleccionados una variante de afinidad basándose en la productividad y afinidad de unión a antígeno de los clones.

Ejemplo 8. Preparación de variantes de anticuerpo que tienen el residuo de desamidación

8-1: Identificación de residuos de desamidación

La reacción de desamidación significa, por ejemplo, que se forma un producto intermedio de succinimida simétrico mediante el ataque al enlace

peptídico en la cadena lateral de asparagina, y este producto intermedio se convierte o bien en ácido aspártico o bien en ácido isoaspártico mediante hidrólisis. Particularmente, cuando la desamidación se produce en la CDR, el anticuerpo se degrada y da lugar a unión débil al antígeno, lo que puede conducir a una eficacia reducida y heterogeneidad de muestra. La heterogeneidad de muestra provoca complejidad debido a su identificación en autorizaciones clínicas. Por tanto, se pretendió identificar la ubicación en la que se produce la desamidación a través de análisis *in silico* y mapeo de péptidos, y finalmente, lograr la estabilidad previniendo la desamidación y obtener una propiedad y eficacia superiores simultáneamente.

Tal como se muestra en la figura 8, la aparición de desamidación real se identificó mediante análisis *in silico* y mapeo de péptidos del clon 1564 parental. A este respecto, las muestras se almacenaron a 4°C o 40°C durante una semana antes de su análisis, y se confirmó que la desamidación se producía en L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR2. También se analizaron las variantes de afinidad dadas a conocer en el ejemplo 7 para confirmar la ubicación de desamidación.

8-2: Preparación de variantes de anticuerpo

El procedimiento de retirada del residuo de desamidación se realizó mediante la sustitución por el siguiente residuo para preparar el mutante:

1) En la secuencia de aminoácidos, Asn se reemplazó por D o Q que son similares a Asn. Si el mutante no presentaba ningún cambio en la afinidad de unión, todos los residuos se reemplazan por Q.

2) N95a, el residuo de desamidación de LCDR3, se reemplazó por H, R y K que tienen carga positiva. Los clones sometidos a este procedimiento de desamidación también se denominan clones de desamidación (de)(StoP).

3) Se sustituyeron los residuos ubicados inmediatamente después de la CDR en la que se produce la desamidación. Estos residuos son residuos

relativamente pequeños y con baja carga (por ejemplo, glicina o serina). Por tanto, al reemplazar los residuos por otros residuos hidrófobos y de tamaño relativamente pequeño (por ejemplo, valina o alanina), se intentó minimizar la diferencia en cuanto a afinidad de unión con el anticuerpo parental (clones antes de la sustitución de residuos) (tabla 21). Los clones sometidos a este procedimiento de desamidación también se denominan clones de desamidación (de2)(StoP). La tabla a continuación muestra cómo reemplazar el residuo contiguo al residuo en el que se produce la desamidación.

Tabla 14

Ubicación en los anticuerpos	CDR (SEQ)	Sitio de desamidación	Sustitución
Cadena ligera	2 (A N <u>S</u> N R P S)	N51	S52V
Cadena ligera	3 (G T W A G S L N <u>G</u> Y V)	N95a	G95bA
Cadena pesada	2 (S Y D N <u>G</u> N)	N54	G55A

Letra en cursiva: residuo de desamidación;
 Letra en negrita y subrayada: residuo que va a reemplazarse

Ejemplo 9. Preparación de diversas formas de anticuerpos anti-IGF1R

9-1: Preparación de minicuerpo anti-IGF1R

Se preparó un minicuerpo conectando el scFv completo del anticuerpo de fago monoclonal específico de IGF1R obtenido en los ejemplos 6 a 8 al extremo C-terminal de Fc. Para ello, se preparó la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de scFv dada a conocer en la tabla 12, y se escindió la secuencia de nucleótidos con una enzima de restricción y se clonó en un vector de expresión basado en pcDNA que contenía una secuencia de nucleótidos que codifica para Fc.

9-2: Preparación de anticuerpo bivalente anti-IGF1R

Se preparó el scFv completo del anticuerpo de fago monoclonal específico de IGF1R obtenido en los ejemplos 6 a 8 y se unieron dos scFv completos a cada extremo C-terminal del anticuerpo terapéutico en forma de IgG para obtener un anticuerpo bivalente. Para ello, se preparó la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de scFv dada a conocer en la tabla 12, se escindió con una enzima de restricción y se clonó en un vector de expresión basado en pcDNA que contenía una secuencia de nucleótidos que codifica para un anticuerpo terapéutico.

9-3: Preparación de anticuerpo IgG (IgG completa) anti-IGF1R

Con el fin de convertir las secuencias del anticuerpo 1564 y del anticuerpo F06 en una forma de IgG1 completa (IgG completa) entre los anticuerpos de fago monoclonales específicos de IGF1R obtenidos en los ejemplos 6 y 7, se sintetizaron las secuencias de nucleótidos de las regiones de cadena pesada y cadena ligera (Genotec Inc.). Los genes sintetizados de cadena pesada y cadena ligera se clonaron en vectores de expresión. Una cadena pesada unida a una molécula de scFv anti-IGF1R, y la otra cadena pesada sin scFv anti-IGF1R y una cadena ligera común constituyeron la forma monovalente de anticuerpo.

9-4: Preparación de anticuerpo monovalente scFv anti-IGF1R

El ejemplo 9-2 es una forma de minicuerpo en la que la forma de scFv de anticuerpo anti-IGF1R se une a cada extremo C-terminal de las dos Fc de la cadena pesada. En este ejemplo, un scFv se une al extremo C-terminal de una única Fc en una cadena pesada. En la forma del anticuerpo obtenida en los ejemplos 6 a 8, se construyeron un vector en el que 1564, F06, C04, VH5, VH16, VH35, VH9, VH2, VH7 y VH32 del anticuerpo de fago monoclonal

específico de IGF1R estaba unido al extremo C-terminal de una única Fc y un vector que no tenía anticuerpo anti-IGF1R unido al extremo C-terminal. Se introdujo la mutación de botón en ojal en las regiones Fc para producir una forma heteromérica, cuando se producen anticuerpos en células.

9-5: Expresión y purificación de diversos anticuerpos anti-IGF1R

Se introdujeron los vectores preparados en los ejemplos 9-1 a 9-4 en células de la siguiente manera.

Específicamente, se ajustaron células CHO-S a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml en medio CD-CHO (Gibco, 10743), y luego se cultivaron en el 8% de CO₂ a 37°C durante 1 día. El día de la transfección de ADN, se prepararon células hechas crecer hasta de $2,5$ a 3×10^6 células/ml a una concentración de $2,1 \times 10^6$ células/ml usando medio CD-CHO que contenía DMSO al 1%, y luego se cultivaron en las condiciones del 8% de CO₂, 37°C durante 3 horas. Después de la centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en medio RPMI 1640 con FBS al 2,5%.

Posteriormente, se diluyó la combinación de los vectores en medio Opti-MEM a 1 µg por ml de medio, y se diluyeron 8 µg de PEI (Polysciences, 23966, concentración madre: 1 mg/ml) por ml de medio de cultivo. Después de mezclar las mezclas de ADN y PEI y dejar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min, se vertió la mezcla en un matraz que contenía células y se incubó durante 4 horas en el 5% de CO₂, 37°C, 100 rpm. Luego, se cultivó la mezcla con la adición de medio CD-CHO al mismo volumen que el volumen de cultivo y se incubó en el 8% de CO₂, 37°C, 110 rpm durante 4 días.

Se hizo pasar la disolución de cultivo obtenida a través de un Mab

selectsure de equilibración (GE Healthcare, 5 ml) equilibrado haciendo pasar un tampón de equilibrado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM) para permitir la unión del anticuerpo expresado a la columna. Después de eso, tras eluir con citrato de Na 50 mM (pH 3,4) y disolución de NaCl 100 mM, se realizó la neutralización usando Tris-HCl 1 M (pH 9,0) de modo que el pH final era de 7,2. Después de eso, se intercambió la disolución de tampón con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4), y cuando la pureza era alta, se almacenó a -20°C después de la formulación, y cuando se requirió purificación adicional, se almacenó a 4°C hasta la purificación adicional.

Cuando se requirió purificación adicional, se purificó usando Hiload superdex 200 (GE Healthcare, n.º de cat. 28-9893-36), y pudo purificarse usando una variedad de cromatografía de exclusión de tamaños diferentes. Después de equilibrar con un tampón de equilibrado (1x solución salina tamponada con fosfato pH 7,4, Gibco, n.º de cat. 10010-023), se cargó la muestra principalmente purificada en la columna. Se almacenó la muestra purificada completamente en un estado congelado a -20°C después de la formulación.

Ejemplo 10. Preparación del anticuerpo biespecífico

Se preparó el anticuerpo anti-IGF1R en forma de scFv según la presente invención uniendo la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera usando un ligador (SEQ ID NO: 134), y se conectó al extremo C-terminal de la región constante de cadena pesada de la forma de IgG completa del anticuerpo anti-alfa-sinucleína usando un ligador (SEQ ID NO: 133) para preparar el anticuerpo biespecífico. Además, como formato de anticuerpo biespecífico, se preparó un anticuerpo monovalente uniendo una molécula de la forma scFv del anticuerpo anti-IGF1R por molécula del anticuerpo IgG del anticuerpo anti-alfa-sinucleína, y se preparó el anticuerpo bivalente uniendo dos moléculas de la forma scFv del anticuerpo anti-IGF1R

por molécula del anticuerpo IgG del anticuerpo anti-alfa-sinucleína, respectivamente.

Las secuencias a modo de ejemplo del anticuerpo anti-alfa-sinucleína usadas para preparar el anticuerpo biespecífico en este ejemplo, y la combinación de la cadena pesada y la cadena ligera recombinantes del anticuerpo biespecífico preparado según la presente invención se muestran en la siguiente tabla 10. El método de preparación específico de anticuerpo biespecífico bivalente y anticuerpo biespecífico monovalente se describe a continuación.

10-1: Clonación del anticuerpo biespecífico bivalente

Con el fin de construir un vector de expresión de anticuerpo biespecífico bivalente, se insertó una secuencia de nucleótidos de anticuerpo que incluía una secuencia señal en un sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pcDNA3.4 (Invitrogen). El vector de expresión de anticuerpo biespecífico era un vector monocistrónico, y se prepararon vectores de expresión de cadena pesada y vectores de expresión de cadena ligera, respectivamente.

A medida que se insertó la secuencia de cadena pesada en el vector de expresión de cadena pesada, el scFv anti-IGF1R se unió mediante un ligador al extremo C-terminal de la inmunoglobulina en la que se unieron la región variable de cadena pesada que codifica para el anticuerpo anti-alfa-sinucleína y la región constante de cadena pesada humana. A medida que se insertó la secuencia de cadena ligera en el vector de expresión de cadena ligera, se unieron la región variable de cadena ligera que codifica para el anticuerpo anti-alfa-sinucleína y la región constante de cadena ligera humana.

10-2: Clonación de anticuerpo biespecífico monovalente

El anticuerpo biespecífico monovalente era un heterodímero compuesto por una cadena pesada (ojal) de una inmunoglobulina anti-alfa-sinucleína en la que el scFv anti-IGF1R se unió al extremo C-terminal y una cadena pesada (botón) de una inmunoglobulina anti-alfa-sinucleína en la que el scFv no estaba unido, y una cadena ligera conjugada con el heterodímero.

Con el fin de aumentar la eficiencia de conjugación del heterodímero de cadena pesada, se usó la técnica de botón en ojal. Es decir, la secuencia codificante de la cadena pesada en el tipo ojal se reemplazó por T366S, L368A y Y406V en la porción CH3, y la secuencia codificante de la cadena pesada en el tipo botón se sustituyó por aminoácido con T366W en la porción CH3.

10-3: Expresión transitoria

Se realizó el vector preparado con maxi-prep (Qiagen) para obtener una gran cantidad de ADN plasmídico. Luego, se introdujeron en células de la siguiente manera. Con el fin de producir el AcB monovalente, se transfectaron el ADN de vector de expresión para la cadena pesada y el ADN de vector de expresión para la cadena ligera a una razón de 1:1. Para producir AcB monovalente, se transfectaron el ADN de vector de expresión para la cadena pesada en el tipo ojal, el ADN de vector de expresión para la cadena pesada en el tipo botón y el ADN de vector de expresión para la cadena ligera a una razón de 0,5:0,5:1.

El día antes de la transfección, se ajustó la concentración de 3×10^6 a 4×10^6 células viables/ml de células ExpiCHO™ (Gibco, n.º de cat. A29127) en medio de expresión ExpiCHO™ (Gibco, n.º de cat. A29100-01), y luego se incubó en el 8% de CO₂, 37°C y 120 rpm durante 1 día. El día de la

transfección de ADN, se hicieron crecer las células hasta de 7×10^6 a 10×10^6 células viables/ml y las que tenían tasas de supervivencia del 95% o más se diluyeron hasta 6×10^6 células viables/ml usando medio nuevo.

Con el fin de transfectar las células parentales, se preparó el complejo de ExpiFectamine™ CHO y ADN plasmídico usando el kit de transfección ExpiFectamine™ CHO (Gibco, n.º de cat. A29129). Se preparó cada uno de los reactivos, ADN y ExpiFectamine™ CHO, a concentraciones apropiadas y se inoculó en el medio OptiPRO™ SFM® (Gibco, n.º de cat. 12309019) anterior que se dispensó y mezcló para dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se inoculó el producto en células parentales y se comenzó a cultivar después de la transfección. El día después de la transfección, se inocularon el potenciador y el alimento incluidos en el kit de transfección ExpiFectamine™ CHO en las células transfectadas, y después de 5 días, se inoculó adicionalmente el alimento y se incubó durante 10 días en el 8% de CO₂, 37°C y 120 rpm para producir las células transfectadas.

10-4: Recogida del medio

Con el fin de obtener la disolución de cultivo de la producción completada, se transfirió el medio de cultivo a un frasco de centrífuga para la centrifugación y se centrifugó a 4°C y 6500 rpm durante 30 minutos, seguido de filtración con un filtro que tenía un tamaño de 0,2 µm para obtener un medio de cultivo mediante la retirada de sólidos suspendidos. Luego, se usó el medio de cultivo obtenido para la purificación posterior.

Ejemplo 11. Análisis de afinidad de unión específica de IGF1R usando anticuerpo anti-IGF1R

11-1: Análisis de afinidad de unión específica de IGF1R usando anticuerpo anti-IGF1R en forma de minicuerpo (ELISA)

El análisis de ELISA se realizó para someter a prueba la afinidad de unión y la unión dependiente de la concentración de las formas de minicuerpo de los clones 996, 1226, 1564 y MKJP2 preparados en el ejemplo 9-1 a IGF1R recombinante.

Específicamente, IGF1R recombinante humano, que es una diana de unión a anticuerpo, es un dominio extracelular (ECD) que se adquirió de R&D Systems (6630-GR/CF). Se diluyó IGF1R humano con 1 ug/ml en tampón PBS, se añadió a una cantidad de 100 ul por pocillo en una placa de ELISA de 96 pocillos (Nunc-Immuno Plates, NUNC, Rochester, NY), se recubrió haciendo reaccionar a 4°C durante 16 horas, y luego se retiró el sobrenadante. Se añadió tampón PBS que contenía BSA al 3% (albúmina sérica bovina) a 200 ul por pocillo y se hizo reaccionar durante 2 horas para bloquear la unión inespecífica.

Se diluyeron 3 veces los anticuerpos de minicuerpo de los clones 996, 1226, 1564 y MKJP2 preparados en el ejemplo 9-1 basándose en la concentración más alta de 20 nM para elaborar 12 puntos, y luego se transfirieron 100 µl a cada pocillo, y luego se trataron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del tratamiento, se lavó 4 veces con tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,05%, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante una hora añadiendo 100 ul de anticuerpo anti-humana conjugado con HRP que reconoce Fc humana del minicuerpo diluido en tampón de bloqueo a 1: 5000 por cada pocillo. Después de lavar 4 veces con 300 ul de PBS-T (Tween 20 al 0,05%), se realizó el desarrollo de color usando TMB (tetrametilbencidina, Sigma, T0440). Se extinguió la reacción enzimática con ácido sulfúrico 0,5 mol/l y se registró y analizó la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas. Los resultados experimentales se muestran en la figura 1a.

Se confirmó que los cuatro clones de minicuerpo se unieron a la

proteína IGF1R recombinante humana de manera dependiente de la concentración, y específicamente, MKJP2 mostró la capacidad de unión más alta, y posteriormente, los clones 996 y 1564 mostraron una fuerza de unión similar y el clon 1226 mostró una fuerza de unión ligeramente más baja.

11-2: Análisis de ELISA de reactividad cruzada interespecífica de anticuerpos contra IGF1R

Se analizó la actividad de unión cruzada interespecífica de los anticuerpos anti-IGF1R 1564 preparados según el método del ejemplo 9-2 y los anticuerpos anti-IGF1R obtenidos en el ejemplo 6-3 mediante análisis de ELISA. Para este fin, en primer lugar, se diluyeron antígenos de IGF1R humano, de mono, de ratón y de rata hasta 1 ug/ml, se añadieron 100 ul a cada pocillo y se hicieron reaccionar a 4°C durante 15 horas para su recubrimiento en la parte inferior de la placa. Después de retirar el sobrenadante, se trataron 200 ul de tampón PBS que contenía BSA al 3% en cada pocillo para bloquear la unión inespecífica. Se diluyeron 5 veces los anticuerpos anti-IGF1R en PBSB (BSA al 3% en PBS) a una concentración máxima de 400 nM, se trataron en cada pocillo y se hicieron reaccionar a 37°C durante 1 hora. Luego, después de lavar con tampón PBS 5 veces, se diluyó 1:20000 el anticuerpo anti-Fab humana conjugado con HRP que reconoce la porción Fab del anticuerpo unido, se trató a 100 ul de cada pocillo y se hizo reaccionar a 37°C durante 1 hora. Se lavó el producto 5 veces con tampón PBS y se realizó el desarrollo de color con TMB (tetrametilbencidina, Sigma, T0440) según el método del fabricante. Se extinguió la reacción enzimática con ácido sulfúrico 0,5 mol/l y se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas (Molecular Devices). Cuando se usan muchas muestras en el análisis de ELISA, las placas se dividieron en dos. Los resultados experimentales se muestran en la tabla 15 a continuación.

Específicamente, los resultados de ELISA de anticuerpos biespecíficos contra IGF1R humano, los resultados de ELISA de IgG 1564 y anticuerpos biespecíficos contra IGF1R humano, los resultados de ELISA de anticuerpos biespecíficos contra IGF1R de ratón y los resultados de ELISA de anticuerpos biespecíficos contra IGF1R de rata, los resultados de ELISA de anticuerpos biespecíficos contra IGF1R de mono se resumen en la tabla 15 a continuación.

Los resultados experimentales a continuación muestran las ventajas de evaluar la eficacia usando modelos animales de diversas especies, y por tanto, puede evaluarse la eficacia de agentes terapéuticos usando el anticuerpo según la presente invención en modelos de enfermedad de diversas especies.

Tabla 15
Resultados del análisis de ELISA de la capacidad de unión del anticuerpo a IGF1R de diversas especies

Experimento	Clon de anticuerpo	CE ₅₀ (nM)
ELISA para IGF1R humano	ch11F11-1564	0,914
	ch11F11-48G5	1,21
	ch11F11-54H4	2,88
	ch11F11-60H6	10
	ch11F11-B11	7,13
ELISA para IGF1R humano	1564 IgG	0,0823
	ch11F11-1564	0,379
ELISA para IGF1R de ratón	ch11F11	N/A*
	ch11F11-1564	3,02
	ch11F11	N/A*
	ch11F11-48G5	6,2
	ch11F11-54H4	N/A
	ch11F11-60H6	18,6
	ch11F11-B11	148
ELISA para IGF1R de rata	ch11F11	N/A*
	ch11F11-1564	1,05

	ch11F11-48G5	2,44
	ch11F11-54H4	14,2
	ch11F11-201**	N/A*
	ch11F11-1564	0,874
	ch11F11-60H6	38
	ch11F11-B11	35,1
ELISA para IGF1R de mono	ch11F11	N/A*
	ch11F11-1564	2,48
	ch11F11-48G5	6,69
	ch11F11-54H4	8,83
	ch11F11-201**	N/A*
	ch11F11-1564	2,21
	ch11F11-60H6	N/A
	ch11F11-B11	180

*: no disponible

**201: forma de scFv de herceptina similar biológicamente

11-3: El análisis de afinidad de unión de la variante de afinidad a IGF1R (FACS)

Se realizó la afinidad de unión de las variantes de afinidad preparadas en el ejemplo 7 mediante ELISA para el ECD de IGF1R y se analizó la afinidad de unión por MCF-7 mediante FACS.

Como análisis para los clones primarios, la tabla 16 muestra los resultados del análisis de ELISA para el ECD de IGF1R en forma de anticuerpo biespecífico de los clones seleccionados de manera primaria correspondientes, y la tabla 17 muestra el resultado de analizar la afinidad de unión a la línea celular MCF-7 mediante FACS.

Tabla 16

Resultados de ELISA de la unión de las formas de anticuerpo biespecífico de clones seleccionados de manera primaria al ECD de IGF1R

Clon de anticuerpo	CE ₅₀ (nM)
ch11F11-1564	0,442
ch11F11-A06	1,19
ch11F11-A07	1,2
ch11F11-B02	0,919
ch11F11-B09	1,08
ch11F11-1564	0,49
ch11F11-D03	0,666
ch11F11-E06	0,668
ch11F11-F06	0,467
ch11F11-H04(G)	0,67
Hu3A9-1564	0,144
Hu3A9-A02	0,13
Hu3A9-A07	0,125
Hu3A9-B10	0,156
Hu3A9-B01	0,145
Hu3A9-C04	0,107
Hu3A9-E09	0,159

Tabla 17
Resultados del análisis de FACS de la unión a la línea celular MCF-7

Muestras	Media geométrica
Ac 2º solo	2,92
1564 parental	4,09
F06	5,02
A07	5,06
B02	4,54
B09	4,29
D03	4,09
E06	4,24
F06	6,33
C04	3,88

Como resultado, se seleccionó el clon F06 como el clon que tenía la capacidad de unión más alta en la unión a células en comparación con el clon parental (clon 1564) (afinidad madurada), y se seleccionó el clon C04 como el clon con la capacidad de unión más baja en la unión a células en

comparación con el clon 1564 parental (afinidad reducida).

Como análisis para los clones secundarios, la tabla 18 muestra los resultados de ELISA para la unión de las formas de anticuerpo biespecífico de clones elaborados en el método de producción secundario al ECD de IGF1R.

Tabla 18
Resultados de ELISA de clones seleccionados de manera secundaria al ECD de IGF1R

Clon de anticuerpo	CE ₅₀ (nM)
Hu11F11(ver.2)-1564	0,259
ch11F11-1564 monovalente	0,347
Hu11F11(ver.2)-C04	0,15
Hu11F11(ver.2)-F06	0,147
Hu11F11(ver.2)-1564	0,864
ch11F11-F06	0,857
Hu11F11(ver.2)-VH2	135
Hu11F11(ver.2)-VH5	0,366
Hu11F11(ver.2)-1564	0,157
Hu11F11(ver.2)-VH7	402
Hu11F11(ver.2)-VH9	6,06
Hu11F11(ver.2)-VH16	0,236
Hu11F11(ver.2)-1564	0,149
Hu11F11(ver.2)-VH32	121
Hu11F11(ver.2)-VH35	0,167
Hu11F11(ver.2)-VH27	N/A*

Se seleccionaron los clones que van a analizarse con análisis de FACS tal como se muestra en la tabla 19, después de excluir los clones que tenían una productividad y propiedades físicas significativamente reducidas entre los clones producidos de manera secundaria.

Tabla 19

Clones que van a analizarse con análisis de FACS

Categoría de afinidad de unión	Clon de anticuerpo	Explicación
Afinidad de unión similar al clon 1564 parental	C04	FACS y análisis <i>in vivo</i>
	F06	FACS y análisis <i>in vivo</i>
	VH5	FACS y análisis <i>in vivo</i>
	VH16	FACS y análisis <i>in vivo</i>
	VH35	FACS y análisis <i>in vivo</i>
Afinidad de unión disminuida en 50 veces	VH9	FACS y análisis <i>in vivo</i>
	C12	Propiedades físicas no deseadas
Afinidad de unión disminuida en 50 veces o más	VH2	FACS y análisis <i>in vivo</i>
	VH6	Propiedades físicas no deseadas
	VH7	FACS y análisis <i>in vivo</i>
	VH27	Propiedades físicas no deseadas
	VH32	FACS y análisis <i>in vivo</i>

La figura 4c es el resultado de analizar la unión de los clones a la línea celular MCF-7 usando FACS, y todos los clones analizados tuvieron una afinidad de unión a MCF-7 más baja en comparación con el clon parental 1564. Los resultados muestran que los clones que muestran capacidad de unión disminuida en ELISA también mostraron capacidad de unión disminuida en FACS.

Los clones de anticuerpo seleccionados son F06, C04, VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 y VH32, y las secuencias de aminoácidos para las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera para estos anticuerpos se muestran en las tablas 4 y 5 anteriormente.

Entre los clones de anticuerpo, se retiraron los focos de desamidación presentes en las variantes de VH5, VH16 y F06 según la tabla 14 del ejemplo 8-2 para preparar mutantes, y las variantes se prepararon como anticuerpos biespecíficos según el ejemplo 10. Se usaron VH5 y VH16 para preparar anticuerpos biespecíficos bivalentes con hu11F11 (ver.2) y se usó F06 para

preparar anticuerpos biespecíficos monovalentes con hu11F11 (ver.2). Usando el anticuerpo biespecífico preparado, se analizaron tres variantes de VH5, VH16 y F06 (es decir, hu11f11-F06, hu11f11-VH5, hu11F11-VH16 como anticuerpos biespecíficos) y mutantes desamidados (es decir, hu11f11-F06(de2)(StoP), hu11f11-VH5(de2)(StoP), hu11F11-VH16(de2)(StoP) como anticuerpos biespecíficos) para determinar la unión a MCF-7 según el método de análisis de FACS anterior. Los componentes de los anticuerpos biespecíficos se describen en la tabla 10 y la sustitución del sitio de desamidación de estos anticuerpos se describe en la tabla 14 del ejemplo 8-2.

Los resultados del análisis de FACS se muestran en la tabla 20 a continuación. Se confirmó que la afinidad de unión de los tres mutantes desamidados (hu11f11-F06(de2)(StoP), hu11f11-VH5(de2)(StoP), hu11F11-VH16(de2)(StoP)) no disminuyó en comparación con los anticuerpos parentales (VH5, VH16, F06).

Tabla 20

Variante	WT	(de2)(StoP)	
	IFM	IFM	% de afinidad de unión con respecto a afinidad de unión de WT
F06 (de2)(StoP)	9,61	8,61	89,59
VH5 (de2)(StoP)	6,44	8,03	124,69
VH16 (de2)(StoP)	6,13	6,42	104,73

* IFM = intensidad de fluorescencia media
 IFM del control negativo (Ac 2º solo): 2,29

Usando los anticuerpos biespecíficos preparados anteriormente, se analizaron la capacidad de unión de tres variantes de VH5, VH16 y F06 y sus mutantes desamidados a la proteína IGF1R humana mediante ELISA según el método del ejemplo 15-2. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Se confirmó que la afinidad de unión de los tres mutantes no disminuyó en comparación con el anticuerpo parental.

Tabla 21

Variante	WT	(de2)(StoP)	
	CE ₅₀ (nM)	CE ₅₀ (nM)	% WT
F06 (de2)(StoP)	0,112	0,0575	195
VH5 (de2)(StoP)	0,125	0,0561	222,81
VH16 (de2)(StoP)	0,143	0,122	117,21

11-4: Análisis de BIAcore para IGF1R humano

Se analizó la capacidad de unión del anticuerpo según la presente invención a IGF1R humano.

Para la forma de IgG del clon 1564, se analizó el grado de unión a IGF1R humano mediante análisis de SPR. Se diluyó el anticuerpo anti-His contra la etiqueta His unida al ECD de IGF1R humano como antígeno hasta 20 µg/ml en tampón acetato pH 4,0, y luego se inmovilizó en el canal de referencia/analítico del chip CM4 a 10.000 UR como UR objetivo según el método de acoplamiento de amina. Durante la captura, se usó PBS como tampón de ejecución, y se mantuvo la velocidad de flujo a 30 µl/min. Durante la asociación/disociación, la velocidad de flujo era de 40 µl/min, y se usó PBS como tampón de ejecución. La asociación/disociación fue de 5 minutos y 20 minutos, respectivamente. El análisis se realizó en el orden de nivel inicial 1, activación (EDC NHS), carga de IGF1R humano, extinción (etanolamina 1 M), nivel inicial 2, asociación y disociación. La evaluación se realizó usando un modelo bivalente, y se analizó usando el software de evaluación Biacore T200 (versión 1.0, S/N: 04Y15X11-0149).

Como resultado del análisis, se confirmó que la KD del anticuerpo IgG 1564 era de $2,5305 \times 10^{-9}$ nM, y se confirmó que la del anticuerpo IgG F06 era de $4,7802 \times 10^{-7}$ nM, mostrando todos ellos una alta capacidad de unión a IGF1R humano. Los resultados del análisis se muestran en la figura 11b. En particular, cuando se produjo el clon 1564 en forma de IgG, el clon 1564 mostró una constante de disociación de $2,5305 \times 10^{-9}$ nM para IGF1R humano, y el clon 1564 confirmó que no había ningún cambio significativo en la afinidad de unión dependiendo de las formas de los anticuerpos.

Ejemplo 12. Análisis de la capacidad de unión para el anticuerpo anti-IGF1R a la línea celular que expresa IGF1R humano y células endoteliales del cerebro

12-1: Análisis de FACS para MCF-7

Para confirmar si las formas de minicuerpo de los clones 996, 1226 y 1564 preparadas en el ejemplo 9-1 se unen a IGF1R endógeno en la superficie celular, se realizó el análisis de la afinidad de unión para líneas celulares que expresan IGF1R humano y células endoteliales del cerebro mediante FACS. Se sometió a prueba el grado de unión a MCF-7, que se sabe que es una línea celular de cáncer de mama que sobreexpresa IGF1R, mediante FACS.

Específicamente, se diluyó cada uno de los tres minicuerpos hasta 20 ug/ml, se trató con $0,43 \times 10^6$ de las líneas celulares MCF-7 por muestra y se hizo reaccionar a 4°C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con tampón PBS, se diluyó el anticuerpo anti-FITC humano a 1:500, se trató y se hizo reaccionar a 4°C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con tampón PBS, se midieron los grados de unión de los minicuerpos anti-IGF1R usando un instrumento FACS Calibur. Se usaron las células MCF-7 tratadas únicamente con anticuerpos secundarios como control. Los resultados

experimentales se muestran en la figura 4a.

Se analizaron A02, A06, A07, B01, B02, B09, B10, C04, D03, E06, F06, H04 (Gly), H04 (Val), VH2, VH5, VH7, VH9, VH16, VH32 y VH35 preparados en el ejemplo 7 y el ejemplo 9-2 para determinar su afinidad de unión a MCF-7 de la misma manera que anteriormente. Se preparó el clon 1564 mediante el método del ejemplo 14-2 y se comparó con los clones parentales, y se usaron células MCF-7 tratadas únicamente con anticuerpos secundarios como controles. Los resultados del análisis se muestran en la figura 4c.

Según los resultados del experimento anterior, se expresó como intensidad de fluorescencia media (IFM) de la muestra, y el scFv en tres minicuerpos, las variantes de afinidad en los anticuerpos biespecíficos y el clon parental (clon 1564) se unieron específicamente al IGF1R endógeno expresado en la superficie celular. El resultado muestra que los clones obtenidos en los ejemplos anteriores pueden usarse con el propósito previsto mediante unión a IGF1R en una forma realmente presente en el cuerpo.

12-2: Análisis de FACS para JIMT-1 y BT474

Los minicuerpos de los clones 996, 1226 y 1564 preparados en el ejemplo 12-1 de manera sustancialmente idéntica, excepto que se usaron JIMT-1 y BT474 de líneas celulares de cáncer de mama en lugar de las líneas celulares MCF-7 usadas en el ejemplo 14-1. Se confirmó que la morfología se unió a IGF1R endógeno en la superficie celular. Los resultados experimentales se muestran en la figura 4a.

Según los resultados experimentales anteriores, se expresó como intensidad de fluorescencia media (IFM) de la muestra correspondiente, y se confirmó que los scFv en los tres minicuerpos sometidos a prueba se unieron específicamente a IGF1R endógeno en la superficie de diversas líneas

celulares que expresan IGF1R.

12-3: Análisis de FACS de células endoteliales del cerebro de ratón

Se analizó si la forma de anticuerpo biespecífico del clon 1564 preparada mediante el método del ejemplo 9-2 y la forma de IgG del clon 1564 preparada mediante el método del ejemplo 14-3 se unían a bEND.3 de la célula endotelial del cerebro. A este respecto, se usaron el grupo tratado únicamente con anticuerpo secundario y el grupo tratado únicamente con anticuerpo terapéutico en forma de IgG (CH11F11) como controles negativos. Se realizó análisis de FACS de la misma manera que en los ejemplos 12-1 y 12-2. Los resultados del análisis se muestran en la figura 4b.

Todos los clones sometidos a prueba mostraron unión a bEND.3 excepto los controles negativos. Los resultados confirmaron que diversas formas del clon 1564 se unieron específicamente a IGF1R expresado en la superficie de células endoteliales del cerebro.

Ejemplo 13. Análisis de la internalización intracelular de anticuerpo anti-IGF1R

13-1: Ensayo de internalización de MCF-7 – 1564, 996, 1226, MKJP2 (minicuerpo)

El ejemplo se llevó a cabo para someter a prueba si las formas de minicuerpo de los clones 996, 1226, 1564 y MKJP2 preparados en el ejemplo 9-1 se internalizaban de manera intracelular en una línea celular que expresa IGF1R, y se hizo pasar el anticuerpo introducido en la célula a través de la ruta de RMT sin degradarse. Con el fin de que el anticuerpo anti-IGF1R se use como lanzadera para mejorar la capacidad de penetración de la BHE, el

anticuerpo debe internalizarse en células endoteliales del cerebro que constituyen la BHE.

Se sometió a prueba la internalización intracelular de los anticuerpos según la presente invención usando la línea celular MCF-7 que expresa IGF1R. Específicamente, después de sembrar 30.000 células MCF-7 en una cámara de portaobjetos de 8 pocillos, se cultivaron las células durante 1 día. Se trataron las líneas celulares cultivadas en cada pocillo a 4°C durante 2 horas con 5 µg/ml de anticuerpos de minicuerpo de los clones 996, 1226, 1564 y MKJP2 preparados en el ejemplo 9-1, se lavaron tres veces con cultivo DMEM frío y también se trataron con anticuerpo anti-Fc humana conjugado con Alexa 488 a 4°C durante 1 hora.

Para someter a prueba la internalización del complejo de anticuerpo, se transfirió la placa a una incubadora de CO₂ y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se fijó el cultivo añadiendo metanol al 100% y se terminó la reacción simultáneamente. Después de la fijación, se lavó 3 veces con PBS. Bajo el microscopio de fluorescencia, se obtuvieron imágenes del grado de internalización del anticuerpo en la región de filtro verde (Alexa 488). En el procedimiento de obtención de imágenes, se tiñeron los núcleos en el interior de las células usando DAPI para confirmar la ubicación de cada célula. Los resultados experimentales se muestran en la figura 5a.

A partir de los resultados experimentales, se mostró que los cuatro anticuerpos sometidos a prueba en el experimento usando la línea celular MCF-7 se internalizan bien. En particular, se halló que la internalización de MKJP2 y 1564 se producía más que otros clones.

13-2: Ensayo de internalización de MCF-7 – C04, F06, VH5, VH16, VH35, VH9, VH2, VH7, VH32

Se sometieron a prueba variantes de 1564 que tenían un cambio en la capacidad de unión a IGF1R o la unión a IGF1R en la superficie celular mediante análisis de FACS usando la línea celular MCF-7 que expresa IGF1R. Se trataron 2×10^5 células MCF-7 con el anticuerpo biespecífico elaborado mediante el anticuerpo anti-IGF1R scFv a una concentración de 10 ug/ml durante 30 minutos. Después de lavar con tampón PBS que contenía BSA al 1%, se trató con el anticuerpo secundario unido con FITC para detectar anticuerpos humanos durante 1 hora. Después de lavar con tampón PBS, el análisis de FACS confirmó la unión extracelular y la internalización de diversas variantes con afinidad de unión cambiada.

Tal como se muestra en la tabla 22, se halló que el anticuerpo biespecífico que incluye anticuerpo contra IGF1R 1564 tenía una internalización aumentada y una intensidad aumentada a 37°C con respecto a la condición refrigerada. Estos resultados sugieren que las variantes de 1564 se unen bien a las células y se internalizan en las células de manera dependiente de la unión.

Tabla 22

Muestra	Media geométrica
	Internalización a 37°C
Sin tratar	1,88
Ac 2º solo	2,86
hu3A9 WT	3,4
hu3A9x1564 WT	7,72
hu11F11 WT	3,18
hu11F11x1564 WT	7,34
hu3A9x1564_C04	7,23
hu3A9x1564_F06	19,8
hu11F11x1564_VH5	6,1
hu11F11x1564_VH16	5,83
hu11F11x1564_VH35	7,28

hu11F11x1564_VH9	5,01
hu11F11x1564_VH2	3,19
hu11F11x1564_VH7	3,84
hu11F11x1564_VH32	3,24

13-3: Análisis de la internalización en células endoteliales del cerebro humanas

Se sometió a prueba si la forma bivalente y la forma monovalente del clon 1564 preparadas en los ejemplos 9-2 y 9-4 se internalizaban en células endoteliales del cerebro microvasculares humanas (HMBEC) primarias. Se usó el anticuerpo terapéutico IgG (11F11) como control negativo.

Se sembraron HMBEC (Cell Systems, n.º de cat.: ACBRI376) en una placa de 12 pocillos al 90% de confluencia, seguido de anticuerpo de prueba. Después de fijar con paraformaldehído al 4% y enjuagar con PBS al siguiente día, se realizaron el bloqueo y la permeabilización usando una disolución que contenía BSA al 3% y TritonX durante 50 minutos. Después de enjuagar con PBS, se incubó un anticuerpo contra Fc humana (anticuerpo de cabra anti-IgG humana) durante 2 horas y 30 minutos, se enjuagó con PBS y se trató con un anticuerpo secundario contra el anticuerpo primario correspondiente durante 1 hora. Después de enjuagar con PBS, se tiñeron las células con Hoechst durante 10 minutos a una concentración de 1:1000 para la tinción nuclear. Se analizó el resultado en condición de LSM 780 NLO EC Plan-Neofluar 100X/1.3 Oil con un microscopio confocal. Los resultados experimentales se muestran en la figura 5b.

La forma bivalente y la forma monovalente del clon 1564 mostraron una internalización aumentada en comparación con el anticuerpo terapéutico de control negativo (11F11). Este resultado muestra que el anticuerpo anti-IGF1R descrito anteriormente puede internalizar eficazmente el anticuerpo terapéutico en células endoteliales del cerebro que constituyen la BHE, a

medida que diversas formas de anticuerpos biespecíficos que contienen un anticuerpo terapéutico se unían a la misma, aumentando de ese modo la capacidad de penetración de la BHE del anticuerpo terapéutico.

13-4: Análisis del destino celular en células endoteliales del cerebro humanas

Si el anticuerpo se internaliza y ubica conjuntamente con un marcador relacionado con el lisosoma en la célula, el anticuerpo no puede pasar a través de la BHE debido a la degradación en la célula endotelial del cerebro. En cambio, si el anticuerpo se ubica conjuntamente con un endosoma temprano asociado con exocitosis o un marcador que se sabe que está asociado con el paso a través de la BHE, se espera que el anticuerpo atraviese la BHE mediante transcitosis mediada por receptor, es decir, que se internalice en las células endoteliales del cerebro y luego salga hacia el cerebro.

Después de tratar las HMBEC de la misma manera con la forma bivalente de 1564 entre los anticuerpos sometidos a prueba en el ejemplo 13-2, se analizó qué componente celular en estas células se ubica conjuntamente con estos anticuerpos. Sin embargo, se trató cada uno de los siguientes anticuerpos simultáneamente con anticuerpos de cabra anti-IgG humana que detectan los anticuerpos tratados después del bloqueo y de la permeabilización.

- Anticuerpo anti-catepsina D: marcador lisosómico
- Anticuerpo anti-caveolina-1: marcador de transcitosis mediada por caveolina (que se piensa que es el principal mecanismo del paso a través de la BHE)
- Anticuerpo anti-EEA1: marcador de endosoma temprano

Las demás partes de los métodos fueron las mismas que en el ejemplo 13-2, pero los anticuerpos secundarios contra los marcadores se trataron respectivamente.

Los resultados del análisis se muestran en la figura 5c. El clon 1564 en forma de anticuerpo biespecífico no se ubicó conjuntamente con catepsina D, pero sí se ubicó conjuntamente con caveolina-1 y EEA1 en el interior de la membrana celular y en las células. Estos resultados indican que, después de que se internalizara el clon 1564, era posible atravesar la BHE a través de la ruta de RMT sin experimentar el mecanismo de degradación intracelular.

Ejemplo 14. Análisis del efecto de anticuerpo anti-IGF1R sobre la señalización de IGF1R

14-1: Ensayo de proliferación de la línea celular MCF-7 usando IGF1R

Se confirmó si el anticuerpo anti-IGF1R según la presente invención interfiere en la unión entre IGF1R (receptor de IGF1) y su ligando usando la eficacia de proliferación celular por IGF1.

Se diluyeron 5 veces los anticuerpos de minicuerpo de los clones 996, 1226, 1564 y MKJP2 preparados en el ejemplo 9-1 desde 400 nM, respectivamente, para preparar muestras diluidas, y luego se trataron 25 µl de las muestras diluidas con 25 µl de IGF1 20 ng/ml, respectivamente. Se cultivó la línea celular MCF-7 que expresa IGF1R, y se sometió a pase retirando el medio el día del experimento, y se añadieron 20.000 células de cada pocillo (correspondientes a 50 µl) a una placa de 96 pocillos en la que se dispensaron IGF1 y anticuerpo de prueba.

Después de incubar a una temperatura y humedad apropiadas durante 3 días, se trataron 10 µl de reactivo CCK-8 con el fin de medir el grado de

crecimiento celular, y se incubaron en una incubadora de CO₂ durante 4-5 horas. Luego, se extrajo y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con el espectrofotómetro. Los resultados experimentales se muestran en la figura 6a.

Según los resultados experimentales, se confirmó que el anticuerpo según la presente invención no inhibió la proliferación celular de MCF-7 provocada por la señalización de IGF1 con respecto a IGF1R. El anticuerpo anti-IGF1R (Imclone) como grupo de control inhibió la proliferación celular de MCF-7 por la señalización de IGF1 con respecto a IGF1R de manera dependiente de la concentración de tratamiento. Por tanto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a IGF1R expresado en células endoteliales que constituyen la BHE y penetrar la BHE, pero no inhibe la señalización por IGF1 en el cuerpo. Por tanto, se confirmó que el anticuerpo según la presente invención pudo usarse como lanzadera de la BHE.

14-2: Análisis de la inhibición de IGF1R del componente de señalización en la línea celular MCF-7

Cuando la unión de IGF1 a las células que expresan IGF1R proporcionó señalización en las células, se sometió a prueba el anticuerpo anti-IGF1R según la presente invención para determinar si IGF1 estaba implicada en el componente de señalización aguas abajo y el receptor de la señalización. Es decir, se trató las líneas celulares MCF-7 que expresan IGF1R con el anticuerpo anti-IGF1R, y luego se analizaron IGF1R total, IGF1R fosforilado, Akt total como factores aguas abajo de IGF1R y cantidad de Akt fosforilada en las células.

Después de cultivar las células MCF-7, se cambió el medio de cultivo por un medio de cultivo libre de suero 20 horas antes del tratamiento con el

anticuerpo anti-IGF1R. Se trataron los anticuerpos de minicuerpo de los clones 996, 1226, 1564 y MKJP2 preparados en el ejemplo 4-1 con 100 nM en las líneas celulares MCF-7, respectivamente, y se trataron con 200 ng/ml de IGF1 después de 1 hora. Después de 20 minutos, se lavaron las células con PBS y luego se sometieron a lisis con M-PER añadido mediante cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Después de medir la concentración de proteína usando el kit de ensayo BCA, se cargaron 12,5 µg de proteína sobre un gel de SDS-PAGE para la electroforesis, y luego se transfirieron a una membrana de PVDF. Se realizó el bloqueo a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 hora con PBST (Tween 20 al 0,1%) que contenía BSA al 5%, y luego se trató con el anticuerpo primario contra IGF1R o Akt con agitación lenta a 4°C durante la noche. Se usó el anticuerpo beta-actina como control de carga. Después del lavado, se trató con el anticuerpo secundario con agitación lenta a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se lavó. Se añadió disolución de ECL, y se observaron las señales usando Image Quant Las 4000. Los resultados experimentales se muestran en la figura 6b.

Según los resultados experimentales, se confirmó que el anticuerpo según la presente invención no afectó a IGF1R total, IGF1R fosforilado, Akt total como factor aguas abajo de IGF1R ni a la cantidad de Akt fosforilada en las células.

14-3: Análisis de la inhibición de IGF1R del componente de señalización en células endoteliales del cerebro de ratón

Cuando la unión de IGF1 a las células que expresan IGF1R proporcionó señalización en las células, se sometió a prueba el anticuerpo anti-IGF1R según la presente invención para determinar si IGF1 estaba implicada en el componente de señalización aguas abajo y el receptor de la señalización. Es decir, se trataron líneas celulares bEND3 que expresan

IGF1R con los anticuerpos monoespecíficos contra alfa-sinucleína 11F11-1564 y 3A9-1564 CH11F11 y ch3A9 (descritos en la patente coreana con n.º de publicación 2018-0081465) producidos mediante el método del ejemplo 9-2 y el clon 1564 en forma de IgG producido mediante el método del ejemplo 9-3, y luego se analizaron IGF1R total, IGF1R fosforilado, Akt total como factores aguas abajo de IGF1R y la cantidad de Akt fosforilada en las células.

Mientras se incubaban las células bEND3, se cambió el medio de cultivo por un medio de cultivo libre de suero 20 horas antes del tratamiento con el anticuerpo anti-IGF1R. Se trataron los anticuerpos biespecíficos de los clones 1564 y MKJP2 del ejemplo 14-2 respectivamente con 100 nM en la línea celular bEND y se trataron con 200 ng/ml de IGF1 después de 1 hora. Después de 20 minutos, se lavaron las células con PBS y luego se sometieron a lisis con M-PER añadido mediante cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Después de medir la concentración de proteína usando el kit de ensayo BCA, se cargaron 12,5 µg de proteína sobre un gel de SDS-PAGE para la electroforesis, y luego se transfirieron a una membrana de PVDF. Se realizó el bloqueo a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 hora con PBST (Tween 20 al 0,1%) que contenía BSA al 5%, y luego se trató con el anticuerpo primario contra IGF1R o Akt con agitación lenta a 4°C durante la noche. Se usó el anticuerpo beta-actina como control de carga. Después del lavado, se trató con el anticuerpo secundario con agitación lenta a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se lavó. Se añadió disolución de ECL, y se observaron las señales usando Image Quant Las 4000. Los resultados experimentales se muestran en la figura 6c.

Según los resultados experimentales, se confirmó que el anticuerpo según la presente invención no afectó a IGF1R total, IGF1R fosforilado, Akt total como factor aguas abajo de IGF1R ni a la cantidad de Akt fosforilada en las células.

Ejemplo 15. Análisis de la capacidad de penetración de la BHE *in vivo* de anticuerpo anti-IGF1R (ensayo de localización conjunta)

15-1. Localización conjunta de minicuerpos con vaso cerebral

Se llevó a cabo el siguiente experimento para confirmar si los anticuerpos anti-IGF1R de la presente invención se distribuían a lo largo de la vasculatura del cerebro *in vivo*.

Específicamente, se administraron tampón PBS o 10 mg/kg de control de IgG, y los anticuerpos de minicuerpo de los clones 996, 1226 y 1564 preparados en el ejemplo 14-1, a la vena de la cola de un ratón macho BALB/c de 6-8 semanas de edad, respectivamente. Después de 4 horas, se perfundió por vía intracardiaca el cerebro del ratón con una cantidad suficiente de disolución de NaCl al 0,9% y paraformaldehído al 4%. Se extrajo el cerebro fijado y se cortó en secciones de 20 µm, y se realizó tinción conjunta con anticuerpo anti-CD31 de ratón como marcador vascular, y anticuerpos anti-Fc humana, para confirmar la localización conjunta de los vasos cerebrales y el IGF1R sometido a prueba. Se usaron un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 para CD31 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 para Fc humana para la obtención de imágenes de CD31 y Fc humana bajo un microscopio de fluorescencia. Los resultados experimentales se muestran en la figura 7a.

Según los resultados experimentales, se confirmó que los anticuerpos no bloqueantes de la unión de ligandos según la presente invención tuvieron una excelente capacidad de penetración de la BHE. Como resultado de la tinción de los tejidos cerebrales con marcadores vasculares (anticuerpo anti-CD31, verde) y anticuerpos humanos (anticuerpo anti-Fc humana, rojo) según el método de análisis del grado de localización conjunta del anticuerpo con vasos sanguíneos cerebrales mediante inmunotinción (Neuron (2016)

Yu-Zuchero *et al.*), los anticuerpos no bloqueantes de la unión de ligandos según la presente invención mostraron un mayor grado de localización conjunta que el grupo de control de IgG.

15-2. Análisis de la capacidad de penetración de la BHE *in vivo* de anticuerpo biespecífico

Se intentó confirmar la capacidad de penetración de la BHE *in vivo* del anticuerpo anti-IGF1R de la presente invención en ratas normales. Se administraron tampón PBS o 10 mg/kg de control de IgG, y anticuerpo terapéutico para la enfermedad de Parkinson (11F11) o el anticuerpo biespecífico bivalente (11F11-1564) que contiene el clon 1564 unido al anticuerpo terapéutico, a la vena de la cola de ratas SD, respectivamente. A las 24 horas, se analizaron las cantidades de anticuerpos en LCR y cerebro mediante espectrometría de masas. La espectrometría de masas se realizó de la misma manera que el método del ejemplo 20-1.

El anticuerpo biespecífico al que estaba unido el clon 1564 mostró una mayor capacidad de penetración del LCR y cerebro que el anticuerpo terapéutico al que no estaba unido el anticuerpo anti-IGF1R, y se confirmó la eficacia a ambas dosis de 10 y 30 mg/kg. El anticuerpo biespecífico mostró una capacidad de penetración del cerebro hasta aproximadamente 4,5 veces mayores que el anticuerpo monoespecífico a la dosis de 30 mg/kg.

Se preparó el clon 1564 en forma bivalente y forma monovalente según los ejemplos 9-2 y 9-4, y luego se administró a 30 mg/kg o 60 mg/kg de la misma manera tal como se describió anteriormente, y se analizaron las cantidades de anticuerpos en LCR y cerebro después de 24 horas. Los dos tipos de anticuerpos biespecíficos unidos al clon 1564 mostraron una mayor capacidad de penetración del LCR y cerebro que los anticuerpos monoespecíficos. En particular, la forma bivalente mostró una mayor

capacidad de penetración de la BHE que la forma monovalente, que aumentó la capacidad de penetración del cerebro en hasta 5 veces.

Los resultados de la figura 7b y la figura 7c muestran que el clon 1564 mejora la capacidad de penetración de la BHE del anticuerpo terapéutico en el cuerpo incluso cuando está unido al anticuerpo terapéutico de diversas formas.

Se esperaba que las variantes de afinidad del clon 1564 preparadas según el ejemplo 2 aumentar la PK en suero en comparación con el clon parental. Por tanto, se esperaba que la capacidad de penetración de la BHE se mejoraría al permanecer en suero durante mucho tiempo y mantener de manera continua el flujo de entrada en la BHE. Después de administrar por vía intravenosa las variantes de afinidad producidas en forma bivalente según el ejemplo 9-2 o en forma monovalente según el ejemplo 9-4 a ratas SD a 30 mg/kg, se extrajo sangre a partir del compartimento de la vena ocular a las 0, 24 y 48 horas. Se dividieron los anticuerpos sometidos a prueba en dos experimentos según la estructura principal del anticuerpo terapéutico. Los anticuerpos biespecíficos de las variantes correspondientes usados en el experimento se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 23

Anticuerpos biespecíficos usados para el análisis de la penetración de la BHE
in vivo

Clones de estructura principal quimérica	Clones de estructura principal humanizada
Ch11F11-1564 bivalente	Hu11F11(ver.2)-1564 bivalente
Ch11F11-1564 monovalente	Hu11F11(ver.2)-VH5 bivalente
Ch11F11-C04 monovalente	Hu11F11(ver.2)-VH16 bivalente
Ch11F11-F06 bivalente	Hu11F11(ver.2)-VH35 bivalente

Ch11F11-F06 monovalente	Hu11F11(ver.2)-VH9 bivalente
**	Hu11F11(ver.2)-VH2 bivalente
**	Hu11F11(ver.2)-VH7 bivalente
**	Hu11F11(ver.2)-VH32 bivalente

Se analizaron los niveles en sangre de los anticuerpos mediante ELISA. Después se recubrió el anticuerpo de cabra anti-Fc humana en una placa de 96 pocillos, se trató una cantidad apropiada de la muestra diluida y luego se detectó con un anticuerpo conjugado con un anticuerpo anti-Fab humana conjugado con HRP. Los resultados del análisis se muestran en la figura 7d y la figura 7e.

Como resultado, en el primer grupo de prueba, la forma monovalente de 1564, la forma monovalente de F06 y la forma monovalente de C04 mostraron una PK en suero más duradera que la bivalente del clon 1564 parental. En el segundo grupo de prueba, las formas bivalentes de VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 y VH32, excepto VH35, mostraron una PK en suero aumentada en comparación con la bivalente 1564 parental.

Con el fin de analizar la capacidad de penetración de la BHE de los grupos, se extrajo LCR a partir de las ratas a las 48 horas y se analizó mediante el mismo método de ELISA. Los resultados del análisis se muestran en la figura 7f.

En el primer grupo de prueba, las formas 1564 monovalente, F06 monovalente y C04 monovalente, que muestran una PK en suero aumentada, mostraron anticuerpo en LCR aumentado en comparación con la bivalente 1564 parental. En el segundo grupo de prueba, las bivalentes de VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 y VH32, que también mostraron una PK en suero aumentada, mostraron anticuerpo en LCR aumentado en comparación con la bivalente 1564 parental. VH35 mostró una PK en suero más corta y un bajo nivel de anticuerpo en LCR en comparación con la bivalente 1564 parental.

Los resultados de la figura 7d, la figura 7e y la figura 7f mostraron que la PK en suero era un factor importante en la capacidad de penetración de la BHE del anticuerpo debido al continuo flujo de entrada en la BHE del anticuerpo, y que aumentaron las capacidades de penetración de la BHE de anticuerpos biespecíficos que tienen lanzadera de BHE y PK en suero. En particular, en el caso de la forma monovalente F06 con el nivel de anticuerpo en LCR más alto, mostró una capacidad de penetración del LCR aproximadamente 5 veces mayor que la bivalente 1564 parental. En los ejemplos 18-2 y 18-3, puesto que el anticuerpo bivalente 1564 mostró una capacidad de penetración del LCR aproximadamente 3 veces mayor que el anticuerpo monoespecífico en LCR, se esperaba que la forma monovalente F06 mostrara una capacidad de penetración de la BHE hasta aproximadamente 15 veces mayor que el anticuerpo monoespecífico.

Ejemplo 16. Mapeo de epítipo de anticuerpos anti-IGF1R

16-1. Análisis de ELISA de anticuerpo anti-IGF1R, proteína IGF1R hervida y proteína IGF1R nativa

Con este ejemplo se intentó confirmar si el anticuerpo anti-IGF1R reconoce un epítipo lineal o un epítipo conformacional. Se realizó ELISA con los anticuerpos biespecíficos bivalentes de 1564, 48G5, 54H4, 60H6 y B11 y proteína del ECD de IGF1R humano nativo o una proteína calentada (IGF1R hervido). Se realizó el método de ELISA de la misma manera que se muestra en el ejemplo 11. Los resultados del análisis se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 24

ID de clon	CE ₅₀ (nM) para IGF1R nativo	CE ₅₀ (nM) para IGF1R hervido
ch11F11-1564	0,914	N/A*
ch11F11-48G5	1,21	N/A
ch11F11-54H4	2,88	N/A
ch11F11-60H6	10	N/A
ch11F11-B11	7,13	410

*N/A: No disponible

Los clones mostraron una unión a la proteína del ECD de IGF1R humano nativo similar al ejemplo 15, pero no se unieron a la proteína del ECD de IGF1 humano hervido, cuya estructura terciaria se destruyó al aplicar calor. Esto significa que el anticuerpo anti-IGF1R de la presente invención se une a un epítipo conformacional, pero no a un epítipo lineal.

16-2. Mapeo de epítipo de anticuerpo anti-IGF1R

Para analizar el epítipo conformacional del clon 1564, se realizó exploración de alaninas de la siguiente manera. Se hizo que la célula OGFAR3, una línea celular de cáncer de ovario que se confirmó que tenía una baja expresión de IGF1R, expresara la biblioteca de IGF1R en la que se fusionó una etiqueta eGFP al extremo N-terminal y se retiró el dominio de cinasa C-terminal. La biblioteca de IGF1R contiene las mutaciones en las que los residuos en la superficie de IGF1R se sustituyen por alanina. Se transfectó la biblioteca preparada en células OVCAR3. Se trataron las células identificadas con expresión de IGF1R con anticuerpo 1564, y luego se marcaron de manera fluorescente tratándolas con un anticuerpo secundario marcado con Dylight650. Se clasificaron las células marcadas según la presencia o ausencia de expresión de IGF1R, la expresión de IGF1R y la presencia o ausencia de unión a 1564, y se realizó secuenciación exhaustiva de ARN usando la técnica HiSeq de Illumina para analizar la frecuencia de

cada mutación de alanina en el grupo de células correspondiente. Se normalizó la frecuencia correspondiente como un resultado para células que expresan IGF1R silvestre, y luego se calculó la frecuencia relativa para seleccionar las mutaciones cuyo número disminuía en el grupo de células marcadas con 1564. Basándose en esta observación, se halló que el epítipo del clon 1564 estaba ubicado en el dominio FN2, y los residuos pertenecientes al mismo eran Y775, P776, F778, R650, S791 y L798. Los resultados y las secuencias reconocidas por el clon 1564 se muestran en la figura 9. Puesto que se desconoce que estos residuos participen en la unión de IGF1 según la bibliografía anterior, los resultados describen de manera fiable las propiedades del clon 1564 en el ejemplo 16-1.

Ejemplo 17. Comparación de las afinidades de unión a antígeno de anticuerpo monoespecífico y anticuerpo biespecífico

17-1: Afinidades de unión de anticuerpo monoespecífico y anticuerpo biespecífico a antígeno de alfa-sinucleína

Cuando se unió la forma de scFv de anticuerpo contra IGF1R al anticuerpo contra alfa-sinucleína en tipo de IgG, se analizó el efecto sobre la afinidad de unión del anticuerpo contra alfa-sinucleína.

Se recubrieron los agregados de alfa-sinucleína en una placa de 96 pocillos a una concentración de 1 ug/ml durante 18 horas, y después del lavado, se trataron con cada anticuerpo diluyendo 5 veces desde 400 nM. Los anticuerpos unidos se unieron a anticuerpo anti-Fc humana conjugado con HRP, y luego se realizó el desarrollo de color con disolución de TMB para medir el grado de unión del anticuerpo.

Tal como se muestra en la figura 10a, se confirmó que la afinidad de unión a agregados de alfa-sinucleína era la misma en el anticuerpo

monoespecífico y el anticuerpo biespecífico.

17-2: Afinidades de unión de anticuerpo monoespecífico y anticuerpo biespecífico a antígeno de IGF1R

Para comparar los grados de unión del anticuerpo contra alfa-sinucleína único y el anticuerpo biespecífico al antígeno de IGF1R, se realizó el experimento de la misma manera que en el ejemplo 22.

Tal como se muestra en la figura 10b, se confirmó que el anticuerpo biespecífico que tenía la forma de scFv de anticuerpo contra IGF1R se unió bien de manera dependiente de la concentración, pero el anticuerpo monoespecífico que no tenía región de anticuerpo contra IGF1R no se unió.

17-3: Análisis de la capacidad de unión de un anticuerpo humanizado contra alfa-sinucleína

Se analizó la diferencia en cuanto a afinidad de unión entre el anticuerpo quimérico biespecífico y el anticuerpo humanizado biespecífico realizando el experimento de la misma manera que en el ejemplo 17-1.

Tal como se muestra en la figura 10c, los anticuerpos humanizados biespecíficos tenían afinidades de unión a agregados de alfa-sinucleína a un nivel similar a los del anticuerpo quimérico biespecífico, y se confirmó que el anticuerpo biespecífico monovalente con un scFv de IGF1R también mostró afinidades de unión a un nivel similar a los anticuerpos quiméricos.

Como resultado de analizar las afinidades de unión a IGF1R entre el anticuerpo quimérico biespecífico y el anticuerpo humanizado biespecífico realizando el experimento de la misma manera que en el ejemplo 17-2, todos los anticuerpos biespecíficos representaron la misma afinidad de unión, pero

el anticuerpo monoespecífico que no tenía scFv de IGF1R no se unió, tal como se muestra en la figura 10d.

Estos resultados sugieren que tiene la misma actividad y no presenta ningún cambio en cuanto a afinidad de unión a agregados de alfa-sinucleína e IGF1R, cuando se humaniza para reemplazar la región de anticuerpo de ratón que actúa como inmunógeno en el cuerpo humano.

17-4: Comparación de fagocitosis del anticuerpo monoespecífico y el anticuerpo biespecífico

La fagocitosis se refiere a la acción de retirada de sustancias extracelulares mediante la implicación de diversos receptores de macrófagos. Diversos agregados de proteína inducen una respuesta inmunitaria o una reacción inflamatoria, que afecta de manera adversa al cuerpo humano. Particularmente, se sabe que se fomenta a través de la interacción entre la región Fc del anticuerpo y FcR en la superficie celular, cuando se administra el anticuerpo para retirar los agregados de alfa-sinucleína. Por este motivo, se comparó la actividad contra la fagocitosis de un anticuerpo monoespecífico y un anticuerpo biespecífico unido con scFv de IGF1R.

Se usaron células de la microglía BV-2 derivadas de ratón para comparar la fagocitosis entre el anticuerpo monoespecífico y el anticuerpo biespecífico. Se cultivaron células BV-2 en medio RPMI1640, preparadas a una concentración de 2×10^6 células/ml, y se dispensaron a 100 μ l en placas de 96 pocillos de fondo en forma de U. Se diluyeron 10 μ g/ml de agregados de alfa-sinucleína y 25 μ g/ml de anticuerpos con medio RPMI1640, se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se trató la mezcla de agregados de alfa-sinucleína y anticuerpos con células BV-2 y se dejó durante 15 minutos. Se retiraron los agregados de alfa-sinucleína en el sobrenadante mediante centrifugación a 1200 rpm y se lavaron tres veces

con tampón PBS (pH 2,5) para retirar los agregados o anticuerpos unidos a la superficie celular. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% y se lavaron con tampón PBS. Para confirmar la fagocitosis de agregados y anticuerpos en las células, se añadió Triton X-100 al 0,5% para debilitar la membrana celular, se lavó con tampón PBS y se trató con pan-anticuerpo contra alfa-sinucleína durante 1 hora. Se trató el pan-anticuerpo contra alfa-sinucleína unido con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa-488 durante 1 hora, y luego el análisis de FACS confirmó que los agregados entraron en la célula por macrofagia.

Tal como se muestra en la figura 10e, se confirmó que la IgG humana normal no afectó a la macrofagia y que aumentó la fagocitosis de agregados de alfa-sinucleína, cuando se trató con el anticuerpo contra alfa-sinucleína. Cuando se compararon el anticuerpo monoespecífico y el anticuerpo biespecífico, se confirmó que se producía fagocitosis a un nivel similar, y que la forma de scFv de anticuerpo contra IGF1R unida al extremo C-terminal de IgG no afectó a la acción del anticuerpo contra alfa-sinucleína.

Ejemplo 18. Evaluación de la eficacia de anticuerpo biespecífico

Según el ejemplo 10, se preparó anticuerpo biespecífico bivalente compuesto por anticuerpo quimérico 11F11 y scFv del clon 1564, y se sometieron a prueba el anticuerpo biespecífico y el anticuerpo contra alfa-sinucleína único para determinar la eficacia *in vivo* en un ratón transgénico (α -sinucleína humana mThy-1, UC San Diego) que sobreexpresa alfa-sinucleína humana. Se administraron por vía intraperitoneal 2,5 mg/kg del anticuerpo monoespecífico o IgG humana, o los mismos moles de los anticuerpos biespecíficos bivalentes, semanalmente durante 3 meses. Se usaron cinco ratones por grupo, y se usaron hermanos de camada no transgénicos como control. Posteriormente, se realizó perfusión de la siguiente manera.

Después de completar la última administración, se anestesiaron los animales con hidrato de cloral según las regulaciones humanitarias y luego se perfundieron con solución salina fisiológica al 0,9% para el análisis de patología en el cerebro. Posteriormente, se almacenó una mitad (sección sagital) de cerebro perfundido en paraformaldehído al 4% (pH 7,4, 4°C) en tampón fosfato hasta el momento del análisis y se congeló inmediatamente (-70°C) la otra mitad.

El análisis patológico se llevó a cabo de la siguiente manera. Se cortó la mitad de cerebro fijada en paraformaldehído en secciones continuas con un grosor de 40 µm mediante flotación libre usando un vibrómetro. Para confirmar el nivel de expresión de alfa-sinucleína en el cerebro de cada grupo de administración, se incubaron las secciones que contenían corteza, hipocampo y cuerpo estriado con anticuerpos contra alfa-sinucleína (anticuerpo contra α -syn p129 de marcador de agregados, Abcam, ab59264, o anticuerpos contra alfa-sinucleína completos) a 4°C durante la noche. Alternativamente, con el fin de analizar el grado de actividad de astrocitos, se analizaron las secciones para determinar GFAP (proteína ácida fibrilar glial) (AB5804, Millipore), o con el fin de analizar el grado de neuroinflamación, se incubaron las secciones con un anticuerpo contra IL-1 β (ab9722, Abcam), respectivamente. Alternativamente, se trató con un anticuerpo contra NeuN (Chemicon, n.º MAB377) para analizar el grado de muerte de células neuronales en el hipocampo. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se trató con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo unido a biotina (1:100, Vector Laboratories) y avidina D-peroxidasa de rábano (1:200, ABC Elite, Vector Laboratories) y se detectó con diaminobencidina (DAB). Se observó cada sección inmunoteñida con un microscopio de campo claro para medir la densidad óptica. Los resultados se dan a conocer en las figuras 11a a 11e.

18-1. Análisis de la capacidad de reducción de alfa-sinucleína por un anticuerpo quimérico y un anticuerpo biespecífico

La figura 11a muestra el resultado de teñir y medir la corteza y el hipocampo entre el tejido cerebral de ratón usando anticuerpo contra α -Syn p-129 después de administrar los anticuerpos al ratón para someter a prueba si el anticuerpo quimérico 11F11 y el anticuerpo biespecífico bivalente compuesto por el clon 1564 y el anticuerpo quimérico 11F11 pueden retirar agregados de alfa-sinucleína en un modelo animal de ratón (TG) que sobreexpresa alfa-sinucleína humana. α -syn p-129 es una forma fosforilada en el 129º residuo y un marcador de agregados, y se representa como manchas o agregados de color marrón oscuro en el tejido teñido.

Según la figura 11a, el grupo tratado con IgG mostró un mayor grado de tinción de α -syn p-129 que el grupo de control no tg (#: ANOVA unilateral, $p < 0.01$). Por el contrario, en el grupo tratado con los anticuerpos monoespecíficos o los anticuerpos biespecíficos, se redujo significativamente el grado de tinción de α -syn p-129 o agregados. En particular, en el hipocampo, el grado de reducción en el grupo de tratamiento con anticuerpo biespecífico fue mayor que el del anticuerpo quimérico 11F11 (*: ANOVA unilateral, $p < 0.05$). La figura 11b muestra el resultado del experimento de la misma manera que en la figura 11a, excepto por la tinción con un anticuerpo contra alfa-sinucleína completo como marcador. La detección de toda la alfa-sinucleína indica que el anticuerpo de la presente invención tiene la capacidad de eliminar la propia alfa-sinucleína e inhibir la transmisión de célula a célula. En otros aspectos, también puede interpretarse como que inhibe la formación de agregados a partir de monómeros o que retira todos los monómeros. El aumento de alfa-sinucleína humana en ratón TG se reduce en comparación con el grupo de administración de IgG mediante la administración de los anticuerpos monoespecíficos y los anticuerpos biespecíficos. En particular, en el hipocampo, los anticuerpos biespecíficos

fueron más eficaces que los anticuerpos monoespecíficos.

Los resultados indican que el anticuerpo quimérico 11F11 y el anticuerpo biespecífico reducen eficazmente los niveles de alfa-sinucleína y sus agregados en modelos animales de enfermedad de Parkinson incluso a una baja dosis de 2,5 mg/kg. En particular, el anticuerpo biespecífico es superior al anticuerpo monoespecífico, lo que sugiere que el anticuerpo biespecífico puede llegar al cerebro más que el anticuerpo monoespecífico y tratar la enfermedad eficazmente basándose en la capacidad de penetración de la BHE mejorada.

18-2. Análisis de la capacidad de reducción de la astrogliosis y del nivel de citocinas inflamatorias del anticuerpo quimérico y el anticuerpo específico

La gliosis es una reacción inespecífica que se produce en las células de la glía en respuesta al daño al sistema nervioso central y se desencadena por el daño a la BHE, o las sustancias tales como TGF-beta e interleucina. De manera representativa, incluye astrogliosis y se usa proteína GFAP como marcador. Por tanto, se analizó el efecto de reducción de la astrocitosis y liberación de citocinas inflamatorias que desencadenan la astrocitosis mediante la administración del anticuerpo quimérico 11F11 y el anticuerpo biespecífico compuesto por el clon 1564 y el anticuerpo quimérico. Los resultados del análisis se dan a conocer en la figura 21c y la figura 21d.

La figura 11c muestra un resultado de teñir y medir el tejido cerebral de ratón usando GFAP (astrogliosis) como marcador, después de administrar los anticuerpos, para someter a prueba si el anticuerpo quimérico 11F11 y el anticuerpo biespecífico compuesto por el clon 1564 y el anticuerpo quimérico preparados en un ejemplo de la presente invención pueden reducir la astrogliosis *in vivo*. El anticuerpo monoespecífico y el anticuerpo biespecífico inhibieron la astrogliosis en comparación con el grupo de control de IgG. En

particular, se confirmó que la eficacia del anticuerpo biespecífico era superior a la del anticuerpo monoespecífico en el cuerpo estriado.

La figura 11d muestra un resultado de teñir y medir el tejido cerebral de ratón usando anticuerpo contra IL-1 beta como marcador, después de administrar los anticuerpos, para someter a prueba si el anticuerpo quimérico 11F11 y el anticuerpo biespecífico compuesto por el clon 1564 y el anticuerpo quimérico preparados en un ejemplo de la presente invención pueden reducir las citocinas inflamatorias *in vivo*. IL-1 beta provoca una inflamación, lo que conduce a muerte y respuesta inflamatoria de diversas neuronas. En el hipocampo de ratas a las que se administraron los anticuerpos según la presente invención, IL-1 beta se redujo en los grupos a los que se administraron anticuerpos monoespecíficos y anticuerpos biespecíficos en comparación con el grupo de control de IgG, y en particular, la capacidad de reducción del anticuerpo biespecífico fue significativamente superior a la del anticuerpo monoespecífico (##: ANOVA unilateral, $p \leq 0,005$; *: ANOVA unilateral, $p \leq 0,05$).

Tal como se muestra en las figuras, se ha mostrado que el anticuerpo según la presente invención reduce la astrogliosis y disminuye la liberación de citocina inflamatoria de IL-1beta, que desencadena la astrogliosis, en comparación con el control.

18-3. Análisis de la capacidad de reducción de la neurodegeneración del anticuerpo quimérico y el anticuerpo biespecífico

En la bibliografía anterior se ha confirmado que la muerte de células del cerebro se produce debido a la neurotoxicidad y a la respuesta inflamatoria de alfa-sinucleína. Se analizó si los anticuerpos monoespecíficos y los anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden inhibir la muerte de células del cerebro provocada por alfa-sinucleína *in vivo*.

Como resultado de teñir con NeuN, que era un marcador de neuronas en la corteza y el hipocampo, se halló que tanto el anticuerpo monoespecífico como el anticuerpo biespecífico redujeron el grado de muerte de células del cerebro en comparación con el grupo de control de IgG. Particularmente, en la corteza, se confirmó que el anticuerpo biespecífico tenía una capacidad de inhibición superior de la muerte de células del cerebro en comparación con el anticuerpo monoespecífico. Los resultados se muestran en la figura 11e.

Ejemplo 19. Aumento de la semivida mediante modificación por ingeniería de Fc y mejora de la capacidad de penetración de la BHE debido al aumento de la semivida

FcRn es un receptor importante en la membrana celular que aumenta la semivida integrando y haciendo circular el anticuerpo en las células, para inhibir la degradación de anticuerpo cuando el anticuerpo circula en los vasos sanguíneos. La capacidad de penetración de la BHE también es importante para la actividad de transcitosis de anticuerpo, pero se sabe bien que la actividad de transcitosis de anticuerpo es importante en la capacidad de penetración de la BHE, pero los anticuerpos pasan a través de BHE dependiendo de la concentración de anticuerpos en los vasos sanguíneos. Por este motivo, con el fin de aumentar la semivida del anticuerpo biespecífico, se prepararon los anticuerpos biespecíficos aumentando la afinidad de unión a FcRn cambiando metionina (Met) por leucina (Leu) en el 428º aminoácido en la región Fc. Como resultado de comparar la semivida mediante la administración de anticuerpo biespecífico WT y anticuerpo biespecífico M428L a una concentración de 10 mg/kg a un ratón tg que expresa FcRn humano, se confirmó que el efecto de aumento de semivida era de aproximadamente el 50%, tal como se muestra en la figura 11. Para volver a confirmar el aumento de semivida, se analizaron los perfiles PK administrando anticuerpo biespecífico WT, anticuerpo biespecífico bivalente M428L y anticuerpo biespecífico monovalente M428L a monos. En el caso

del anticuerpo biespecífico WT, tal como se muestra en la figura 22a, la concentración en sangre disminuyó rápidamente después de 168 horas, mientras que los anticuerpos biespecíficos M428L con alta afinidad de unión a FcRn mantuvieron una concentración en sangre mejorada en comparación con WT. Se confirmó que la semivida aumentó en aproximadamente 1,5 días en el anticuerpo biespecífico M428L en comparación con el anticuerpo biespecífico WT. En particular, en cuanto a eliminación, el anticuerpo biespecífico monovalente M428L tuvo la mejor eliminación y el anticuerpo biespecífico WT mostró la eliminación más rápida (figura 12b).

Para verificar la mejora en el paso a través de la BHE debido al efecto de aumento de semivida, se extrajo LCR a las 24 horas después de la administración del anticuerpo y se analizó la cantidad de anticuerpo en el LCR. Después de recubrir 100 ng/ml de IGF1R en un estado refrigerado durante 18 horas, se añadió LCR para detectar el anticuerpo unido a IGF1R. Tal como puede observarse en la figura 12c, se confirmó que la cantidad de anticuerpo biespecífico M428L que pasa a través de la BHE, que tenía una gran cantidad de anticuerpos en la sangre, era grande y que el anticuerpo biespecífico monovalente M428L mostró una capacidad de penetración de la BHE mejorada con respecto al anticuerpo biespecífico bivalente M428L, así como una excelente capacidad de penetración de la BHE.

Ejemplo 20. Evaluación de la eficacia de anticuerpos biespecíficos basados en variante de afinidad desamidada

Se produjeron anticuerpos biespecíficos monovalentes incluyendo hu11F11(ver.2) (anticuerpo humanizado de 11F11) y scFv de F06 (variante de afinidad de 1564), especialmente anticuerpos biespecíficos que incluían mutante que se habían modificado en algunos residuos de CDR para retirar la desamidación (incluyendo hu11F11(ver.2)-F06(de2)(StoP) monovalente), según el ejemplo 10. Se sometieron a prueba el anticuerpo biespecífico y el

anticuerpo monoespecífico contra alfa-sinucleína preparados y se compararon para determinar la eficacia *in vivo* en un ratón transgénico que sobreexpresa alfa-sinucleína humana (α -sinucleína humana mThy-1, UC San Diego).

Específicamente, a un ratón transgénico de 4 meses de edad, se le administraron por vía intraperitoneal 20 mg/kg de hu11F11 (ver.2) y 23,4 mg/kg de anticuerpo biespecífico equivalente al mismo número de moles a las 0, 72, 144 ó 192 horas durante 8 días. Veinticuatro horas después de la última dosis, se anestesiaron los animales con hidrato de cloral y se les realizó perfusión cardiaca con solución salina al 0,9%. Se aislaron los cerebros y se ultracongelaron a -70°C hasta el momento del análisis. Se trituró el tejido cerebral y se centrifugó para retirar el residuo, y se obtuvo el sobrenadante. Se analizó para determinar α -syn mediante análisis de ELISA para medir cuantitativamente la cantidad de α -syn en el lisado cerebral (Invitrogen n.º KHB0061). El resultado se muestra en la figura 13.

Tal como se muestra en la figura 13 , el anticuerpo humanizado 11F11(ver.2) y el anticuerpo biespecífico basado en la variante F06 desamidada preparados en un ejemplo de la presente invención disminuyeron α -syn en el cerebro en comparación con el control de IgG. En particular, el anticuerpo biespecífico mostró una capacidad superior para reducir α -syn en el cerebro en comparación con el anticuerpo monoespecífico de α -syn.

Ejemplo 21. Análisis de la afinidad de unión a antígeno específica de IGF1R (ELISA) para el anticuerpo biespecífico que incluye anticuerpo anti-IGF1R desamidado (de2)(StoP)

Este ejemplo se realizó para someter a prueba si el anticuerpo biespecífico que incluye el anticuerpo anti-IGF1R desamidado según el

ejemplo 8 tiene una afinidad de unión a antígeno normal y analizar simultáneamente la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo anti-IGF1R desamidado en diversos anticuerpos anti-IGF1R y los formatos de anticuerpo biespecífico de diferentes maneras. Para este fin, se produjeron el anticuerpo biespecífico monovalente y el anticuerpo biespecífico bivalente, incluyendo cada uno anticuerpos no desamidados (silvestres), anticuerpos desamidados (de)(StoP) y anticuerpos desamidados (de2)(StoP), preparados basándose en los clones F06, VH5 y VH16 anti-IGF1R. Se analizaron cuantitativamente su afinidad de unión y unión dependiente de la concentración a IGF1R recombinante y se compararon a través de ELISA de tipo sándwich. Se usó el clon hu11F11 (ver.2) como anticuerpo anti- α -syn.

Se adquirió IGF1R recombinante humano de un antígeno para la unión de anticuerpo a partir de Sino Biological como dominio extracelular (ECD) (10164-H08H). En una placa de ELISA de 96 pocillos (Nunc-Immuno Plates, NUNC, Rochester, NY), se diluyó IGF1R humano hasta 1 ug/ml en tampón PBS y se colocó en 100 ul por pocillo, seguido de reacción a 4°C durante 16 horas, y después del recubrimiento, se retiró el sobrenadante. Se añadieron 200 ul de tampón PBS que contenía BSA (albúmina sérica bovina) al 1% por pocillo y se hicieron reaccionar a 37°C durante 2 horas para bloquear la unión inespecífica.

Se diluyeron cinco veces los anticuerpos biespecíficos preparados y cada anticuerpo de control (anticuerpo silvestre y desamidado (de)(StoP)) hasta una concentración máxima de 400 nM para producir ocho (8) puntos. Se añadieron las disoluciones diluidas a cada pocillo a 100 μ l, y se hicieron reaccionar a 37°C durante 2 horas para unir los anticuerpos al antígeno recubierto. Después de completarse la reacción, se realizó el lavado 4 veces usando 300 ul de tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,05%, y se diluyó 1:2000 el anticuerpo anti-Fc humana conjugado con HRP que reconoce la Fc humana presente en el anticuerpo biespecífico en tampón de bloqueo en

cada pocillo. Se hicieron reaccionar 100 ul de cada uno durante 1 hora a 37°C. Después de volver a lavar 4 veces usando 300 ul de PBS-T (Tween 20 al 0,05%), se usó TMB (tetrametilbencidina, Sigma, T0440) para desarrollar color. Se detuvo la reacción enzimática con ácido sulfúrico 0,5 mol/l, y se registró y analizó la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas (Molecular Devices). Los resultados experimentales se muestran en las figuras 14a a 14c y la tabla 25. La figura 14a es un resultado experimental para el anticuerpo monovalente F06, anticuerpo monovalente F06(Stop) y anticuerpo F06(de2)(Stop), la figura 14b es un resultado experimental para el anticuerpo VH5, anticuerpo VH5(de)(Stop) y anticuerpo VH5(de2)(Stop), y la figura 14c es un resultado experimental para el anticuerpo VH16, anticuerpo VH16(de)(Stop) y anticuerpo VH16(de2)(Stop).

Según las figuras 14a, 14b y 14c, independientemente del tipo de clon anti-IGF1R y del formato monovalente/bivalente, el anticuerpo desamidado (de2)(StoP) mantuvo la capacidad de unión a antígeno al nivel del silvestre no desamidado, y tuvo una excelente capacidad de unión a antígeno en comparación con el anticuerpo desamidado (de)(StoP). La tabla 25 a continuación muestra los resultados experimentales del anticuerpo no desamidado (silvestre), anticuerpo desamidado (de)(StoP) y anticuerpo desamidado (de2)(StoP) basados en F06, VH5 y VH16.

Tabla 25

Clones	(de)(StoP)		(de2)(StoP)	
	CE ₅₀ (nM)	% WT	CE ₅₀ (nM)	% WT
F06 mono	4,24	2,64	0,0575	195,00
VH5 bi	1,19	10,50	0,0561	222,81
VH16 bi	1,25	11,44	0,122	117,21

La tabla 25 muestra la comparación de los valores numéricos obtenidos a partir de los resultados de ELISA de tipo sándwich de anticuerpo desamidado (de)(StoP) y anticuerpo desamidado (de2)(StoP). Según el

resultado de la tabla 25, se confirmó que, independientemente del tipo de clon anti-IGF1R y del formato monovalente/bivalente, el anticuerpo desamidado (de2)(StoP) tuvo una excelente capacidad de unión a antígeno en comparación con el anticuerpo desamidado (de)(StoP).

Ejemplo 22. Análisis de la afinidad de unión a antígeno específica de IGF1R en la superficie celular (FACS) para el anticuerpo biespecífico que incluye anticuerpo anti-IGF1R desamidado (de2)(StoP)

Se realizó el análisis de la afinidad de unión a antígeno específica de IGF1R en la superficie celular mediante FACS usando anticuerpos biespecíficos desamidados (de2)(StoP) y sus anticuerpos silvestres y anticuerpos biespecíficos desamidados (de)(StoP) como controles usados en el ejemplo 21. Se usaron células MCF-7 que sobreexpresan IGF1R en el análisis.

Específicamente, se diluyó cada anticuerpo biespecífico hasta 10 ug/ml, se le añadieron las líneas celulares MCF-7 a $0,5 \times 10^6$ células MCF-7 y se hicieron reaccionar a 4°C durante 2 horas. Después de lavar dos veces usando tampón PBS, se diluyó 1:1000 el anticuerpo anti-FITC humano y se trató, y se hizo reaccionar a 4°C durante 1 hora. Después de volver a lavar dos veces con tampón PBS, se midió el grado de unión de AcB anti-IGF1R usando un instrumento FACSCalibur. Como control, se usaron células MCF-7 tratadas únicamente con anticuerpo secundario, y los resultados experimentales se muestran en las figuras 15a a 15c.

Como resultados experimentales, similares a los resultados confirmados en el ejemplo 21, la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo desamidado (de2) (StoP) fue equivalente a la del anticuerpo silvestre no desamidado, y mostró una capacidad de unión a antígeno superior en comparación con el anticuerpo desamidado (de)(StoP), independientemente

del tipo de clon anti-IGF1R y del formato monovalente/bivalente.

Ejemplo 23. Análisis de la capacidad de penetración de la BHE *in vivo* para el anticuerpo biespecífico basado en anticuerpo anti-IGF1R desamidado (de2)(StoP)

Se confirmó la capacidad de penetración de la BHE *in vivo* del anticuerpo biespecífico que incluía el anticuerpo anti-IGF1R desamidado según el ejemplo 8 en ratas SD (Sprague-Dawley). Los grupos experimentales y las dosis se resumen en la tabla a continuación.

Tabla 26

ID de clon	Dosis
hu11F11(ver.2)	30 mg/kg
hu11F11(ver.2)-1564 monovalente	35,46 mg/kg
hu11F11(ver.2)-F06 monovalente(de)(StoP)	35,46 mg/kg
hu11F11(ver.2)-F06 monovalente(de2)(StoP)	35,46 mg/kg

Tal como se describe en la tabla 26, se analizó la cantidad de anticuerpos en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) 24 horas después de una única administración de anticuerpo monoespecífico contra α -syn o anticuerpo biespecífico contra α -syn/IGF1R en la vena caudal de las ratas mediante análisis de espectrometría de masas. Se realizó el método de espectrometría de masas específico sustancialmente de la misma manera que en el ejemplo 15, y el resultado del análisis se muestra en la figura 16.

En la figura 16, la concentración en suero, que representa la concentración en sangre de anticuerpo 24 horas después de la administración, y se observó de manera similar en anticuerpo desamidado (de)(StoP) y anticuerpo desamidado (de2)(StoP). Por otro lado, la concentración en líquido cefalorraquídeo, que representa el suministro del anticuerpo al cerebro, fue la más alta en el anticuerpo desamidado

(de2)(StoP). Esto muestra que el anticuerpo biespecífico de la presente invención muestra una excelente capacidad de penetración de la BHE por el anticuerpo anti-IGF1R desamidado.

Con el fin de observar la eficacia del anticuerpo biespecífico de la presente invención durante un periodo de tiempo más largo, después de administrar una vez el anticuerpo monoespecífico anti-alfa-sinucleína de hu11F11 (ver.2) y hu11F11(ver2)-F06 monovalente(de2)(StoP), que era biespecífico desamidado (de2)(StoP,) en la vena caudal de las ratas, se analizaron las cantidades de anticuerpos en suero, líquido cefalorraquídeo y cerebro hasta 168 horas después de la administración mediante análisis de espectrometría de masas. Se realizó el método de espectrometría de masas específico sustancialmente de la misma manera que en el ejemplo 15, y el resultado del análisis se muestra en la figura 17.

Según la figura 17, la concentración en suero del anticuerpo se observó de manera similar para el anticuerpo monoespecífico anti-alfa-sinucleína y el anticuerpo biespecífico desamidado (de2)(StoP). Sin embargo, en el caso de la concentración en el líquido cefalorraquídeo, que representa el suministro del anticuerpo al cerebro, en comparación con el anticuerpo monoespecífico, el área bajo la curva (AUC) del anticuerpo biespecífico desamidado (de2)(StoP) aumentó aproximadamente 5,8 veces y la concentración en el líquido cefalorraquídeo a las 24 horas fue aproximadamente 10 veces o más en el anticuerpo biespecífico desamidado (de2)(StoP). Además, la concentración en cerebro también aumentó aproximadamente 7,9 veces en el área bajo la curva (AUC) en el anticuerpo biespecífico desamidado (de2)(StoP), en comparación con el anticuerpo monoespecífico. A partir de este resultado, se confirmó que el anticuerpo biespecífico de la presente invención mostró una excelente capacidad de penetración de la BHE al incluir el anticuerpo contra IGR1R desamidado (de2)(StoP).