

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 324**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2013 PCT/EP2013/067595**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14033074**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2013 E 13756076 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2890712**

54 Título: **Lanzadera de barrera hematoencefálica**

30 Prioridad:

29.08.2012 EP 12182181

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.11.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BOHRMANN, BERND;
FRESKGARD, PER-OLA;
MAIER, PETER;
NIEWOEHNER, JENS;
TISSOT-DAGUETTE, ALAIN y
URICH, EDUARD**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 733 324 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Lanzadera de barrera hematoencefálica

- 5 La presente invención se refiere a una lanzadera de barrera hematoencefálica que se une a receptores en la barrera hematoencefálica (R/BHE) y a procedimientos de uso de la misma.

Antecedentes

- 10 La penetración en el cerebro de fármacos para trastornos neurológicos, tales como, por ejemplo, fármacos bioterapéuticos grandes o fármacos de molécula pequeña que tienen una penetración baja en el cerebro, está estrictamente limitada por la barrera hematoencefálica (BHE) extensa e impermeable conjuntamente con el otro componente celular en la unidad neurovascular (NVU). Se han sometido a prueba muchas estrategias para superar este obstáculo y una es utilizar rutas de transcitos mediadas por receptores endógenos expresados en el endotelio capilar cerebral. Se han diseñado proteínas recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales o péptidos, contra estos receptores para permitir el suministro mediado por receptor de productos bioterapéuticos al cerebro. Sin embargo, las estrategias para maximizar la captación cerebral al tiempo que se minimiza la clasificación errónea dentro de las células endoteliales cerebrales (BEC), y el grado de acumulación dentro de determinados orgánulos (especialmente orgánulos que dan lugar a la degradación del producto bioterapéutico) en las BEC, permanecen sin explorar.

- 20 Los anticuerpos monoclonales y otros productos bioterapéuticos tienen un enorme potencial terapéutico para el tratamiento de patologías en el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, su ruta hacia el cerebro está impedida por la BHE. Estudios anteriores han ilustrado que un porcentaje muy pequeño (aproximadamente un 0,1 %) de una IgG inyectada en la circulación sanguínea puede penetrar en el compartimento del SNC (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52: 1158-1164 (1974)). Esto ciertamente limitará cualquier efecto farmacológico debido a la baja concentración dentro del SNC del anticuerpo.

- 25 El documento WO 2012/075037 divulga un anticuerpo biespecífico de longitud completa que comprende un fragmento Fab anti-BACE1 y un fragmento Fab contra el receptor de la transferrina. Este anticuerpo biespecífico funciona como una lanzadera de barrera hematoencefálica.

- 30 El documento US 2005/147613 divulga anticuerpos biespecíficos que comprenden un anticuerpo de longitud completa contra el receptor de la transferrina y un anticuerpo de longitud completa anti-Abeta o un fragmento Fab anti-transferrina y un fragmento Fab anti-abeta. Ambas construcciones funcionan como lanzadera para la barrera hematoencefálica.

- 35 Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas de suministro de fármacos para trastornos neurológicos a través de la BHE para transportar los fármacos al cerebro eficazmente.

Sumario

- 40 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una lanzadera de barrera hematoencefálica que comprende una entidad efectora cerebral, un conector y una entidad de unión monovalente que se une a un receptor de transferrina, en la que el conector acopla la entidad efectora a la entidad de unión monovalente que se une a la receptor de transferrina, en la que la entidad de unión monovalente que se une al receptor de transferrina comprende un scFab dirigido al receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO 14, 15 o 16 y en la que la entidad efectora cerebral se selecciona del grupo que consiste en fármacos para trastornos neurológicos, factores neurotróficos y anticuerpos dirigidos a una diana cerebral seleccionada del grupo que consiste en β -secretasa 1, A β , factor de crecimiento epidérmico, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, Tau, Tau fosforilado, apolipoproteína E4, alfa-sinucleína, fragmentos oligoméricos de alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica, cinasa de repetición rica en leucina 2, parkina, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor de muerte 6, proteína precursora del amiloide, receptor de neurotrofina p75 y caspasa 6.

- 45 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la entidad efectora cerebral se selecciona del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos y péptidos.

- 50 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la entidad efectora cerebral comprende un anticuerpo de longitud completa dirigido a una diana cerebral, preferentemente una IgG de longitud completa.

- 55 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la lanzadera de barrera hematoencefálica comprende un anticuerpo IgG de longitud completa como entidad efectora cerebral, el conector y un scFab que se une al receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 14, 15 o 16, en el que el scFab se acopla por el conector al extremo C-terminal de la parte Fc de una de las cadenas pesadas del anticuerpo IgG.

En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la entidad efectora es un anticuerpo de longitud completa dirigido a A β .

5 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, el anticuerpo dirigido a A β comprende (a) H-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 5; (b) H-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 6; (c) H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 7; (d) L-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 8; (e) L-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 9 y (f) L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 10.

10 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, el anticuerpo dirigido a Abeta comprende un dominio V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 11 y un dominio V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 12.

15 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la primera cadena pesada del anticuerpo de la lanzadera de barrera hematoencefálica dirigido a una diana cerebral comprende un primer módulo de dimerización y la segunda cadena pesada del anticuerpo de la lanzadera de barrera hematoencefálica contra una diana cerebral comprende un segundo módulo de dimerización que permite la heterodimerización de las dos cadenas pesadas.

20 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, el primer módulo de dimerización de la primera cadena pesada del anticuerpo de la lanzadera de barrera hematoencefálica dirigido a la diana cerebral comprende botones y el módulo de dimerización de la segunda cadena pesada del anticuerpo de la lanzadera de barrera hematoencefálica dirigido a la diana cerebral comprende ojales de acuerdo con la estrategia de botón en ojal.

25 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la entidad efectora es un anticuerpo de longitud completa dirigido a Tau fosforilado.

30 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la entidad efectora es un anticuerpo de longitud completa dirigido a alfa-sinucleína.

35 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, el conector es un conector peptídico, preferentemente un péptido que es una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 25 aminoácidos, más preferentemente con una longitud de 30 a 50 aminoácidos, dicho conector es, en particular, (G₄S)₆G₂ o (G₄S)₄.

40 Los tres modos de realización siguientes de la invención se refieren a una lanzadera de barrera hematoencefálica en la que la entidad efectora cerebral es una proteína, polipéptido o péptido, con la condición de que la entidad efectora cerebral no sea un anticuerpo de longitud completa, en particular una IgG de longitud completa.

45 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la entidad de unión monovalente que se une al receptor de transferrina comprende una entidad CH2-CH3 de Ig y un scFab que se une al receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 14, 15 o 16, en la que el scFab se acopla a un extremo C-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig por un segundo conector.

50 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la lanzadera de barrera hematoencefálica comprende la entidad efectora cerebral, el conector, el dominio CH2-CH3 de Ig, el segundo conector y un scFab que se une al receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 14, 15 o 16, en la que la entidad efectora cerebral se acopla por el primer conector a un extremo N-terminal del dominio CH2-CH3 de Ig y el scFab se acopla a un extremo C-terminal del dominio CH2-CH3 de Ig por el segundo conector.

55 En un modo de realización particular de la lanzadera de barrera hematoencefálica, la entidad CH2-CH3 de Ig es una entidad CH2-CH3 de IgG.

La lanzadera de barrera hematoencefálica de la presente invención se puede usar como un medicamento, en particular se puede usar para el tratamiento de un trastorno neurológico tal como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

60 La lanzadera de barrera hematoencefálica de la presente invención se puede usar para transportar la entidad efectora cerebral a través de la barrera hematoencefálica.

65 En un modo de realización particular, la cadena pesada del anticuerpo IgG de la lanzadera de barrera hematoencefálica de la presente invención acoplada en su extremo C-terminal de la parte de Fc al scFab como entidad de unión monovalente que se une al receptor de barrera hematoencefálica tiene la siguiente estructura:

- cadena pesada de IgG,
- conector que acopla el extremo C-terminal de la parte de Fc de la cadena pesada de IgG al extremo N-terminal del dominio VL del scFab,
- dominio variable de cadena ligera (VL) y dominio C-kappa de cadena ligera del scFab,
- conector que acopla el extremo C-terminal del dominio C-kappa de cadena ligera del scFab al extremo N-terminal del dominio VH del scFab,
- dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo scFab y dominio CH3 de IgG de cadena pesada.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión para transportar una entidad efectora cerebral a través de la barrera hematoencefálica que comprende una entidad CH2-CH3 de Ig, un conector y un scFab dirigido a un receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 14, 15 o 16, en la que el scFab se acopla a un extremo C-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig por el conector y en la que la entidad efectora cerebral se selecciona del grupo que consiste en fármacos para trastornos neurológicos, factores neurotróficos y fragmentos de anticuerpo dirigidos a una diana cerebral seleccionada del grupo que consiste en scFv, Fv, scFab, Fab, VHH, F(ab')₂ o péptidos dirigidos a una diana cerebral y en el que la diana cerebral se selecciona del grupo que consiste en β -secretasa 1, A β , factor de crecimiento epidérmico, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, Tau, Tau fosforilado, apolipoproteína E4, alfa-sinucleína, fragmentos oligoméricos de alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica, cinasa de repetición rica en leucina 2, parkina, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor de muerte 6, proteína precursora del amiloide, receptor de neurotrofina p75 y caspasa 6.

En un modo de realización particular de la proteína de fusión de la presente invención, la proteína de fusión de la presente invención comprende además un conector en el extremo N-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig para acoplar la entidad efectora cerebral al extremo N-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig.

En un modo de realización particular de la proteína de fusión de la presente invención, el conector es un conector peptídico, en particular un péptido que es una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 15 aminoácidos, más en particular con una longitud de 20 a 50 aminoácidos, del modo más particular dicho conector tiene la secuencia de aminoácidos (G₄S)₆G₂ (SEQ ID. NO 13) o (G₄S)₄ (SEQ ID. NO 17).

En un modo de realización particular de la proteína de fusión de la presente invención, la entidad CH2-CH3 de Ig es una entidad CH2-CH3 de IgG.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado que comprende una proteína de fusión de la presente invención y una entidad efectora cerebral acoplada a un extremo N-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig de la proteína de fusión de la presente invención mediante un conector.

En un modo de realización particular del conjugado de la presente invención, la entidad efectora cerebral es un factor neurotrófico y en la que el conector que acopla el factor neurotrófico al extremo N-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig es un conector peptídico.

Además, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende el conjugado de la presente invención y un vehículo farmacéutico, el uso del conjugado como medicamento, en particular el uso del conjugado para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, en particular la enfermedad de Alzheimer.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Diferentes formatos de lanzaderas de barrera hematoencefálica (proteínas de fusión) usados en los ejemplos. 1A: IgG dirigida a A β (mAb31). 1B: Fab único (sFab = scFab único) dirigido a TfR acoplado a la parte Fc de una IgG dirigida a A β (mAb31). 1C: Fab doble (dFab = scFab doble) dirigido a TfR acoplado a la parte Fc de una IgG dirigida a A β (mAb31). La estructura de scFab se fusiona con el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo IgG.

Fig. 2: Propiedades de unión de las proteínas de fusión hacia estructuras de A β . La afinidad de unión se midió usando una configuración ELISA que muestra que las construcciones de Fab han conservado las propiedades de unión a A β . Unión de construcciones de mAb31-8D3 a fibrillas de Abeta. Mientras que 8D3 (cuadrados blancos) no se une a fibrillas Abeta inmovilizadas, mAb31-8D3-dFab (cuadrados negros), mAb31-8D3-sFab (triángulos blancos) y mAb31 (triángulos negros) se unen con afinidades similares.

Fig. 3: Propiedades de unión de las construcciones hacia el receptor de transferrina (TfR). La afinidad de unión se midió usando una configuración ELISA que muestra que solo las construcciones Fab se unen al receptor de transferrina (TfR) y la construcción de Fab doble tiene una afinidad aparente ligeramente mayor debido al modo de unión bivalente. Unión de construcciones de mAb31-8D3 a mTfR. Mientras que mAb31 (triángulos negros) no se une

a mTfR inmovilizado, mAb31-8D3-dFab (cuadrados negros) se une con una afinidad similar a la del anticuerpo original 8D3 (cuadrados blancos). La construcción monovalente mAb31-8D3-sFab (triángulos blancos) muestra una afinidad de unión intermedia.

5 Fig. 4: Decoración de placa del anticuerpo monoclonal anti-A β mAb31 (Fig. 4A), Fab único-mAb31 (scFab único fusionado al extremo C-terminal de mAb31) (Fig. 4B) y Fab doble-mAb31 (scFab dobles fusionados al extremo C-terminal de mAb31) (Fig. 4C). Construcción inyectada en ratones PS2APP ($n = 3$ /construcción), dosis intravenosa única de 10 mg/kg y, a continuación, perfusión cerebral 8 horas después de la dosis. El análisis incluyó
10 inmunohistoquímica y microscopía confocal para la unión a placa. Los datos muestran que solo la construcción Fab único-mAb31 puede atravesar la BHE y unirse a las placas. La figura muestra un área representativa del cerebro de todos los animales.

Fig. 5: Muestra la cuantificación de la construcción Fab doble-mAb31. La tinción de placa y capilar se cuantificó en los tres animales tratados en tres regiones diferentes (9 áreas en total para cada construcción). Los datos muestran que
15 solo hay un aumento en los capilares para la construcción Fab doble-mAb31 en comparación con mAb31. No se detectaron niveles aumentados de Fab doble-mAb31 en la placa (dentro del cerebro). Cuantificación de mAb31 (control de HEK) frente a Fab doble-mAb31, 10 mg/kg, 8 h después de la dosis.

Fig. 6: Muestra la cuantificación de la construcción Fab único-mAb31. La tinción de placa y capilar se cuantificó en los tres animales tratados en tres regiones diferentes (9 áreas en total para cada construcción). Los datos muestran que
20 hay un aumento masivo en las placas de la construcción Fab único-mAb31 en comparación con mAb31. La cuantificación de la señal de fluorescencia indica un aumento de más de 50 veces del Fab único-mAb31 en comparación con la construcción de mAb31. También hay una tinción transitoria en los capilares para la construcción de Fab único-mAb31 en comparación con mAb31, que indica que se atraviesa la BHE. Cuantificación de mAb31 (control de HEK) frente a Fab único-mAb31 10 mg/kg, 8 h después de la dosis y 25 mg/kg, 24 h después de la dosis.
25

Fig. 7: Decoración de placa del anticuerpo monoclonal anti-A β mAb31 a dos dosis diferentes y del Fab único-mAb31 (scFab único fusionado al extremo C-terminal de mAb31) a una dosis muy baja. Construcción inyectada en ratones PS2APP ($n = 3$ /construcción), dosis intravenosa única y, a continuación, perfusión cerebral en diversos puntos
30 temporales después de la dosis. El análisis incluyó inmunohistoquímica y microscopía confocal para la unión a placa. Los datos muestran que solo la construcción Fab único-mAb31 puede atravesar la BHE y unirse a las placas. La exposición cerebral es muy rápida para la construcción Fab único-mAb31 y la decoración de placa es sostenible durante al menos una semana a partir de una sola administración.

Fig. 8: Cuantificación de la expresión en la superficie celular de TfR tratado con Fab único-mAb31 o Fab doble-mAb31. Regulación por disminución en la superficie celular del receptor de transferrina (TfR) por la construcción Fab doble-
35 mAb31. Se incubaron durante 24 horas células endoteliales cerebrales que expresan el TfR con la construcción Fab único-mAb31 (Fig. 8A) o la construcción Fab doble-mAb31 (Fig. 8B). Solo la construcción de Fab doble-mAb31 disminuía el nivel de TfR expresado en la superficie celular.
40

Fig. 9: Transmigración de células *in vivo* de TfR tratado con Fab único-mAb31 o Fab doble-mAb31. Primeros puntos temporales que investigan la tinción de capilares y placas *in vivo*. Tanto sFab-MAb31 (Fig. 9A) como dFab-MAb31 (Fig. 9B) decoran la vasculatura cerebral 15 minutos después de la inyección sin diferencia en su distribución. 8 horas
45 después de la inyección, sFab-MAb31 alcanza el parénquima y decora las placas de amiloide (flechas, Fig. 9C) mientras que dFab-MAb31 permanece dentro de la vasculatura cerebral de forma similar al punto temporal de 15 minutos (Fig. 9D). No se detectaron placas de amiloide en el parénquima para el dFab-MAb31.

Fig. 10: Transmigración de células *in vivo* de TfR tratado con Fab único-mAb31 o Fab doble-mAb31. Para controlar la integridad de todas las construcciones usadas en el estudio, se realizó la tinción de criosecciones cerebrales de ratones APP transgénicos de 18 meses usando MAb31 (Fig. 10A), sFab-MAb31 (Fig. 10B) o dFab-MAb31 (Fig. 10C). La figura 10D muestra los resultados del control. Los resultados mostraron que las 3 construcciones detectaban placas
50 de amiloide en el cerebro de ratones transgénicos.

Fig. 11: Transmigración de células *in vivo* de TfR tratado con Fab único-mAb31. La microscopía confocal de alta resolución en muestras tratadas *in vivo* muestra que los sFab-MAb31 no decoran el lado luminal de los capilares
55 cerebrales, sino que están contenidos dentro de estructuras similares a vesículas que atraviesan la membrana luminal de las células endoteliales y dentro del citosol de las células endoteliales. Las flechas en la Fig. 11 indican vesículas que contienen construcciones de sFab-MAb31 en el lado abluminal de los núcleos de células endoteliales. Estos datos sugieren que sFab-MAb31 puede tanto entrar en las células endoteliales cerebrales como atravesar la vasculatura y alcanzar las placas de amiloide dentro del espacio parenquimatoso del cerebro (compárese con la figura 9A y C).
60

Fig. 12: Transmigración de células *in vivo* de TfR tratado con Fab doble-mAb31. La microscopía confocal de alta resolución en muestras tratadas *in vivo* muestra que los dFab-MAb31 no decoran el lado luminal de los capilares
65 cerebrales, sino que están contenidos dentro de estructuras similares a vesículas que atraviesan la membrana luminal de las células endoteliales y dentro del citosol de las células endoteliales. Las flechas en la fig. 12 indican vesículas que contienen construcciones de dFab-MAb31 en el lado abluminal de los núcleos de células endoteliales. Estos datos

sugieren que los dFab-MAb31 pueden entrar en las células endoteliales cerebrales, pero que están atrapados y no pueden atravesar la vasculatura y, por lo tanto, no pueden alcanzar las placas de amiloide dentro del espacio parenquimatoso del cerebro (compárese con la figura 9B y D).

5 Fig. 13: Exposición cerebral y decoración de placa después de administración i.v. Fig. 13A: Las construcciones de mAb31, dFab y sFab se inyectaron por vía intravenosa en animales transgénicos PS2APP a 10 mg/kg, los animales se perfundieron y se sacrificaron 8 horas después de la inyección. No se detectó un aumento significativo en la decoración de placa para dFab en comparación con mAb31. Para la construcción de sFab, se detectó una decoración de placa 55 veces mayor que el mAb31 original basada en la intensidad de fluorescencia a 555 nm del anticuerpo de
10 detección. Tinción inmunohistoquímica representativa en corteza de mAb31 (Fig. 13B), dFab (Fig. 13C) y sFab (Fig. 13D) 8 horas después de la inyección. El dFab muestra solo tinción de microvasos, mientras que el sFab decora las placas de amiloide- β de forma extensa. Fig. 13E: Demostración de que una dosis baja de la construcción de sFab (2,66 mg/kg) alcanza rápida y significativamente las placas en el cerebro en comparación con 2 mg/kg y 10 mg/kg de mAb31. La interacción con la diana de la construcción de sFab es sostenible durante al menos una semana después de la inyección. La tinción inmunohistoquímica muestra la decoración de placa para mAb31 a 2 mg/kg (Fig. 13F) y sFab a 2,66 mg/kg (Fig. 13G) 7 días después de la inyección.

Fig. 14: Eficacia *in vivo* en un estudio crónico en ratones PS2APP portadores de placa tratados con 14 inyecciones i.v. semanales. Se muestra la unión a placa diana de las construcciones administradas unidas a placas residuales al final del estudio para mAb31 a dosis baja, mAb31 a dosis media, sFab a dosis baja y sFab a dosis media, respectivamente (Fig. 14A-D). Se muestra el análisis morfométrico cuantitativo después de tinción inmunohistoquímica de las placas para la corteza y el hipocampo (Fig. 14 E). La carga de placa de los animales no tratados sacrificados a una edad de 4,5 meses se muestra como nivel de valor referencia de la amiloidosis al inicio del estudio. Es evidente una reducción significativa en los números de placas después del tratamiento con sFab a dosis media en comparación con la formación progresiva de placa observada en animales tratados con vehículo; aparece una tendencia a una formación de placa reducida incluso con el sFab a dosis baja. Por tanto, la construcción de sFab reduce significativamente los números de placas tanto en la corteza como en el hipocampo. El análisis de los tamaños de placa reveló una reducción de los números de placas más pronunciada para tamaños de placa pequeños. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Fig. 15: El anticuerpo multimérico con fragmentos scfab de TfR fusionados con el extremo C de Fc no induce ADCC. Se midió la muerte mediada por NK92 de células de eritroleucemia de ratón BA/F3 cuantificando la liberación de LDH. Solo las construcciones multiméricas con el resto Fab de unión a TfR en la orientación "convencional" "N-terminal a Fc" inducen una ADCC significativa, mientras que las construcciones de lanzadera del cerebro en orientación inversa son inactivos.

Fig. 16: El scFab-8D3 dirigido al receptor de transferrina se une a tres péptidos distintos en el dominio extracelular del receptor de transferrina de ratón. Se reveló la unión del anticuerpo 8D3 a péptidos de 15 meros que se superponen con tres aminoácidos mediante la detección quimioluminiscente del anticuerpo incubado en un portaobjetos CelluSpot que porta péptidos de mTfR inmovilizados. Recuadro: Péptidos n.º 373, 374 y 376 unidos por 8D3 (SEQ ID. NO 15, 16 y 17).

Descripción detallada de modos de realización de la invención Definiciones

45 La "barrera hematoencefálica" o "BHE" hace referencia a la barrera fisiológica existente entre la circulación periférica y el cerebro y la médula espinal, que está formada por uniones estrechas dentro de las membranas plasmáticas del endotelio capilar del cerebro, creando una barrera hermética que restringe el transporte de moléculas al cerebro, incluso de moléculas muy pequeñas tales como urea (60 dáltones). La BHE del cerebro, la barrera hematomedular de la médula espinal y la barrera hematorretiniana de la retina son barreras capilares contiguas del SNC, y se denominan conjuntamente en el presente documento barrera hematoencefálica o BHE. La BHE también abarca la barrera hemocefalorraquídea (plexo coroideo) donde la barrera está compuesta de células ependimarias en lugar de células endoteliales capilares.

Se describen los módulos de dimerización de botón en ojal y su uso en ingeniería de anticuerpos en Carter P.; Ridgway JBB; Presta LG: Immunotechnology, volumen 2, número 1, febrero de 1996, págs. 73-73(1)).

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

60 Un "receptor de la barrera hematoencefálica" (abreviado "R/BHE" en el presente documento) es una proteína receptora unida a la membrana extracelular expresada en células endoteliales cerebrales que puede transportar moléculas a través de la BHE o ser usada para transportar moléculas administradas exógenas. Los ejemplos de R/BHE en el presente documento incluyen: receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor de factor de crecimiento insulínico (IGF-R), receptores de lipoproteínas de baja densidad incluyendo, sin limitación, la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y la proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), y el factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-

EGF). Un R/BHE ejemplar en el presente documento es el receptor de transferrina (TfR).

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

La "entidad de unión monovalente" se refiere a una molécula que se puede unir específicamente y en un modo de unión monovalente a un R/BHE. La lanzadera hematoencefálica y/o conjugado de la presente invención se caracterizan por la presencia de una unidad única de entidad de unión monovalente, es decir, la lanzadera hematoencefálica y/o conjugado de la presente invención comprenden una unidad de la entidad de unión monovalente. La entidad de unión monovalente de la divulgación incluye, pero no se limita a, proteínas, polipéptidos, péptidos y fragmentos de anticuerpos que incluyen fragmentos Fab, Fab', Fv, moléculas de anticuerpos monocatenarios tales como, por ejemplo, Fab monocatenario, scFv. La entidad de unión monovalente puede ser, por ejemplo, una proteína de armazón genomanipulada usando tecnologías del estado de la técnica como la presentación en fagos o la inmunización. La entidad de unión monovalente también puede ser un péptido. La entidad de unión monovalente de la invención comprende un Fab monocatenario (scFab). En determinados modos de realización, la entidad de unión monovalente comprende un dominio CH2-CH3 de Ig y un Fab monocatenario (scFab) dirigido a un receptor de la barrera hematoencefálica. El scFab está acoplado al extremo C-terminal del dominio CH2-CH3 de Ig mediante un conector. En determinados modos de realización, el scFab se dirige al receptor de transferrina.

El "modo de unión monovalente" se refiere a una unión específica al R/BHE, donde la interacción entre la entidad de unión monovalente y el R/BHE tiene lugar a través de un único epítipo. El modo de unión monovalente evita cualquier dimerización/multimerización del R/BHE debido a un único punto de interacción con epítipo. El modo de unión monovalente evita que se cambie la clasificación intracelular del R/BHE.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico que se puede unir específicamente a un anticuerpo. En determinados modos de realización, el determinante epítípico incluye agrupamientos de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales glucídicas, fosforilo o sulfonilo y, en determinados modos de realización, puede tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo.

El "receptor de transferrina" ("TfR") es una glucoproteína transmembrana (con un peso molecular de aproximadamente 180 000) compuesta de dos subunidades unidas por un puente disulfuro (cada una con un peso molecular aparente de aproximadamente 90 000) implicadas en la captación de hierro en los vertebrados. En un modo de realización, el TfR del presente documento es TfR humano que comprende la secuencia de aminoácidos como en Schneider *et al.* Nature 311: 675-678 (1984), por ejemplo.

Un "trastorno neurológico", como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad o trastorno que afecta al SNC y/o que tiene una etiología en el SNC. Los ejemplos de enfermedades o trastornos del SNC incluyen, pero no se limitan a, neuropatía, amiloidosis, cáncer, una enfermedad o trastorno ocular, infección vírica o microbiana, inflamación, isquemia, enfermedad neurodegenerativa, convulsiones, trastornos del comportamiento y una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Para los fines de la presente solicitud, se entenderá que el SNC incluye el ojo, que normalmente está separado del resto del cuerpo por la barrera hematorretiniana. Los ejemplos específicos de trastornos neurológicos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades neurodegenerativas (incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome de pospoliomielitis, síndrome de Shy-Draeger, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Parkinson, atrofia sistémica múltiple, degeneración estriatonigral, tauopatías (incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear), enfermedades priónicas (incluyendo, pero no limitado a, encefalopatía espongiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt-Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, caquexia crónica e insomnio familiar letal), parálisis bulbar, enfermedad de la motoneurona y trastornos heterodegenerativos del sistema nervioso (incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis cerioide neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del cabello ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden-Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch-Nyhan y síndrome de Unverricht-Lundborg), demencia (incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de Pick y ataxia espinocerebelosa), cáncer (por ejemplo, del SNC y/o el cerebro, incluyendo las metástasis cerebrales resultantes de cáncer en otras partes del cuerpo).

Un "fármaco para trastornos neurológicos" es un fármaco o agente terapéutico que trata uno o más trastornos neurológicos. Los fármacos para trastornos neurológicos de la invención incluyen, pero no se limitan a, compuestos de molécula pequeña, anticuerpos, péptidos, proteínas, ligandos naturales de una o más dianas del SNC, versiones modificadas de ligandos naturales de una o más dianas del SNC, aptámeros, ácidos nucleicos inhibidores (es decir, ARN inhibidores pequeños (ARNip) y ARN de horquilla corta (ARNhc)), ribozimas y moléculas pequeñas, o fragmentos activos de cualquiera de los anteriores. Se describen ejemplos de fármacos para trastornos neurológicos de la invención en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos, aptámeros, proteínas, péptidos,

ácidos nucleicos inhibidores y moléculas pequeñas y fragmentos activos de cualquiera de los anteriores que son por sí mismos o reconocen específicamente y/o actúan sobre (es decir, inhiben, activan o detectan) un antígeno o molécula diana del SNC tales como, pero no limitado a, proteína precursora de amiloide o partes de la misma, amiloide beta, beta-secretasa, gamma-secretasa, tau, alfa-sinucleína, parkina, huntingtina, DR6, presenilina, ApoE, glioma u otros marcadores de cáncer del SNC y neurotrofinas. Ejemplos no limitantes de fármacos para trastornos neurológicos y los trastornos correspondientes en los que se pueden usar como tratamiento: factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)-lesión cerebral crónica (neurogénesis), anticuerpo anti-factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)-cáncer cerebral, factor neural derivado de la línea celular glial (GDNF)-enfermedad de Parkinson, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)-esclerosis lateral amiotrófica y depresión, enzima lisosómica-trastornos de almacenamiento lisosómico del cerebro, factor neurotrófico ciliar (CNTF)-esclerosis lateral amiotrófica, neuregulina-1-esquizofrenia, anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, trastuzumab)-metástasis cerebrales por cáncer HER2 positivo.

Un "agente de formación de imágenes" es un compuesto que tiene una o más propiedades que permiten detectar directa o indirectamente su presencia y/o localización. Los ejemplos de dichos agentes de formación de imágenes incluyen proteínas y compuestos de molécula pequeña que incorporan una entidad marcada que permite la detección.

Un "antígeno del SNC" o "antígeno cerebral" es un antígeno y/o molécula expresado en el SNC, incluyendo el cerebro, la que se puede dirigir un anticuerpo o una molécula pequeña. Los ejemplos de dicho antígeno y/o molécula incluyen, sin limitación, beta-secretasa 1 (BACE1), amiloide beta (A β), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 de repetición rica en leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor de muerte 6 (DR6), proteína precursora de amiloide (APP), receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) y caspasa 6. En un modo de realización, el antígeno es BACE1.

Una proteína de "secuencia natural" en el presente documento se refiere a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína encontrada en la naturaleza, incluyendo variantes naturales de la proteína. El término, como se usa en el presente documento, incluye la proteína como se aísla de una fuente natural de la misma, o producida de forma recombinante.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos inalterados y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Los "fragmentos de anticuerpo" en el presente documento comprenden una parte de un anticuerpo inalterado que retiene la capacidad de unirse al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias tales como, por ejemplo, Fab monocatenario (scFv) scFv y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. El formato "Fab monocatenario" se describe, por ejemplo, en Hust M. *et al.* BMC Biotechnol. 2007 Mar 8;7:14.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto las posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, que, en general, son variantes que están presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar mediante el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, Nature 256:495, 1975 o se pueden elaborar por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo. Los ejemplos específicos de anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos miméticos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del Viejo

Mundo, tal como babuino, macaco de la India o macaco cangrejero) y secuencias de región constante humanas (patente de EE. UU. n.º 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Se pueden realizar estas modificaciones para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, a excepción de la(s) sustitución(ones) de FR indicadas anteriormente. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature 321 :522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo humano" en el presente documento es uno que comprende una estructura de secuencia de aminoácidos que se corresponde con la estructura de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo obtenible a partir de un linfocito B humano, e incluye fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos se pueden identificar o elaborar mediante una variedad de técnicas que incluyen, pero no se limitan a: la producción por animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, después de la inmunización, producir anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena (véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); y las patentes de EE. UU. n.º 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807); la selección de colecciones de presentación en fagos que expresan anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos (véanse, por ejemplo, McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553 (1990); Johnson *et al.*, Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993); Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Griffith *et al.*, EMBO J. 12:725-734 (1993); las patentes de EE. UU. n.º 5.565.332 y 5.573.905); la generación por medio de linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.567.610 y 5.229.275); y el aislamiento de hibridomas que producen anticuerpos humanos.

Un "anticuerpo multiespecífico" en el presente documento es un anticuerpo que tiene especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos multiespecíficos ejemplares se pueden unir tanto a un R/BHE como a un antígeno cerebral. Los anticuerpos multiespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). También se contemplan anticuerpos genomanipulados con dos, tres o más (por ejemplo, cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2002/0004587 A1, Miller *et al.*). Los anticuerpos multiespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos del presente documento incluyen "variantes de secuencia de aminoácidos" con la unión al antígeno o la actividad biológica alterada. Los ejemplos de dichas alteraciones de aminoácidos incluyen anticuerpos con afinidad potenciada por el antígeno (por ejemplo, anticuerpos de "afinidad madurada") y anticuerpos con la región Fc alterada, si está presente, por ejemplo, con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (aumentada o disminuida) (véanse, por ejemplo, el documento WO 00/42072, Presta, L. y el documento WO 99/51642, Iduosogie *et al.*); y/o una semivida serica aumentada y/o disminuida (véase, por ejemplo, el documento WO 00/42072, Presta, L.).

Una "variante de afinidad modificada" tiene uno o más residuos sustituidos en las regiones hipervariables o marco de un anticuerpo original (por ejemplo, de un anticuerpo original quimérico, humanizado o humano) que alteran (aumentan o reducen) la afinidad. En un modo de realización, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para desarrollo adicional tendrá(n) afinidad reducida por el R/BHE de acuerdo con la presente invención. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución usa la presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se criban entonces por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis por barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. De forma alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y su diana. Dichos residuos de contacto y residuos cercanos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas detalladas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado y los anticuerpos con afinidad alterada

se pueden seleccionar para un desarrollo adicional.

El anticuerpo del presente documento puede ser una "variante de glucosilación" de modo que se altera cualquier hidrato de carbono unido a la región Fc, si está presente. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura glucídica madura que carece de fucosa fijada a una región Fc del anticuerpo en la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, F.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se referencian anticuerpos con una *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) de bisección en el hidrato de carbono fijado a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y la patente de EE. UU. n.º 6.602.684, Umana *et al.* Se informa de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Véanse también los documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) referentes a anticuerpos con hidratos de carbono alterados fijados a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*) que describe anticuerpos con glucosilación modificada. El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Polypeptides of Immunological Interest, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los residuos "marco" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, como se definen en el presente documento.

Un "anticuerpo de longitud completa" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y los dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no está conjugado a una molécula heteróloga, tal como una entidad citotóxica, polímero o radiomarcador.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la unión al receptor de Fc, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), etc. En un modo de realización, el anticuerpo del presente documento carece esencialmente de función efectora.

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células diana humanas por un anticuerpo en presencia de células efectoras. El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" indica un proceso iniciado por la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpos IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está causada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión a la parte Fc son conocidos en el estado de la técnica. Dichos sitios de unión a la parte Fc se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran activación del complemento incluyendo la unión a C1q y C3, mientras que la IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une a C1q y/o C3.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa se pueden asignar a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos de longitud completa: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de ellos se pueden dividir a su vez en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Son bien conocidas las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas. El término "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o fragmento de unión a antígeno del mismo) que se expresa por una célula huésped recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Los ejemplos de "células huésped" para producir anticuerpos recombinantes incluyen: (1) células de mamífero, por ejemplo, de ovario de hámster chino (CHO), COS, células de mieloma (incluyendo células Y0 y NS0), de riñón de cría de hámster, células HeLa y Vero (BHK); (2) células de insecto, por ejemplo, sf9, sf21 y Tn5; (3) células de plantas, por ejemplo, plantas que pertenecen al género *Nicotiana* (por ejemplo, *Nicotiana tabacum*); (4) células de levadura, por ejemplo, las que pertenecen al género *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) o al género *Aspergillus* (por ejemplo, *Aspergillus niger*); (5) células bacterianas, por ejemplo, células de *Escherichia coli* o células de *Bacillus subtilis*, etc.

Como se usa en el presente documento, "se une específicamente" o "se une específicamente a" se refiere a un anticuerpo que se une selectiva o preferentemente a un antígeno. La afinidad de unión se determina, en general, usando un ensayo estándar, tal como análisis de Scatchard, o la técnica de resonancia de plasmón superficial (por

ejemplo, usando BIACORE®).

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo competitivo en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo competitivo en un 50 % o más.

El término "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos (por ejemplo, At211, I1131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 y los isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

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

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. La región Fc comprende los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Región marco" o "FR" se refiere a los residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

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

Un "conjugado" es una proteína de fusión de la presente invención conjugada a una o más moléculas heterólogas incluyendo, pero no limitada a, un marcador, fármaco para trastorno neurológico o agente citotóxico.

Un "conector" como se usa en el presente documento se refiere a un conector químico o un conector peptídico monocatenario que conecta covalentemente las diferentes entidades de la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o la proteína de fusión y/o el conjugado de la presente invención. El conector conecta, por ejemplo, la entidad efectora cerebral a la entidad de unión monovalente. Por ejemplo, si la entidad de unión monovalente comprende una entidad CH2-CH3 de Ig y un scFab dirigido al receptor de la barrera hematoencefálica, entonces el conector conecta el scFab al extremo C-terminal de la entidad CH3-CH2 de Ig. El conector que conecta la entidad efectora cerebral a la entidad de unión monovalente (primer conector) y el conector que conecta el scFab al extremo C-terminal del dominio CH2-CH3 de Ig (segundo conector) puede ser el mismo o diferente.

También se pueden usar conectores peptídicos monocatenarios, compuestos de uno a veinte aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En determinados modos de realización, los aminoácidos se seleccionan de los veinte aminoácidos naturales. En determinados de otros modos de realización, uno o más de los aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. En otros modos de realización, el conector es un conector químico. En determinados modos de realización, dicho conector es un péptido monocatenario con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 25 aminoácidos, preferentemente con una longitud de 32 a 50 aminoácidos. En un modo de realización, dicho conector es (GxS)_n, con G = glicina, S = serina, (x = 3, n = 8, 9 o 10, y m = 0, 1, 2 o 3) o (x = 4 y

n = 6, 7 u 8 y m = 0, 1, 2 o 3), preferentemente con x = 4, n = 6 o 7 y m = 0, 1, 2 o 3, más preferentemente con x = 4, n = 7 y m = 2. En un modo de realización, dicho conector es (G₄S)₄ (SEQ ID. NO 17). En un modo de realización, dicho conector es (G₄S)₆G₂ (SEQ ID. NO 13).

5 La conjugación se puede realizar usando una variedad de conectores químicos. Por ejemplo, la entidad de unión monovalente o la proteína de fusión y la entidad efectora cerebral se pueden conjugar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP), 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo),
10 aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bisazido (tales como bis-(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bisactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación de la entidad efectora después del suministro al cerebro. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, un conector sensible a peptidasa, un conector fotolábil, un conector de dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Res. 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

La conjugación covalente puede ser directa o por medio de un conector. En determinados modos de realización, la conjugación directa es por construcción de una proteína de fusión (es decir, por fusión genética de los dos genes que codifican la entidad de unión monovalente hacia R/BHE y la entidad efectora y expresada como una única proteína). En determinados modos de realización, la conjugación directa es por formación de un enlace covalente entre un grupo reactivo de una de las dos partes de la entidad de unión monovalente hacia R/BHE y un grupo correspondiente o aceptor en la entidad efectora cerebral. En determinados modos de realización, la conjugación directa es por modificación (es decir, modificación genética) de una de las dos moléculas que se va a conjugar para incluir un grupo reactivo (como ejemplos no limitantes, un grupo sulfhidrilo o un grupo carboxilo) que forma una unión covalente con la otra molécula que se va a conjugar en las condiciones apropiadas. Como un ejemplo no limitante, una molécula (es decir, un aminoácido) con un grupo reactivo deseado (es decir, un residuo de cisteína) se puede introducir en, por ejemplo, la entidad de unión monovalente hacia el anticuerpo contra la R/BHE, y formar un enlace disulfuro con el fármaco neurológico. Los procedimientos para la conjugación covalente de los ácidos nucleicos a proteínas también son conocidos en la técnica (es decir, fotorreticulación, véase, por ejemplo, Zatssepín *et al.* Russ. Chem. Rev. 74:77-95 (2005)) La conjugación también se puede realizar usando una variedad de conectores. Por ejemplo, una entidad de unión monovalente y una entidad efectora se pueden conjugar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo (SPDP), 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bisazido (tales como bis-(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bisactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). También se pueden usar conectores peptídicos, que comprenden de uno a veinte aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En determinados de dichos modos de realización, los aminoácidos se seleccionan de los veinte aminoácidos naturales. En determinados de otros de dichos modos de realización, uno o más de los aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación de la entidad efectora después del suministro al cerebro. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, un conector sensible a peptidasa, un conector fotolábil, un conector de dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Res. 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Un "marcador" es un marcador acoplado con la proteína de fusión del presente documento y se usa para la detección o la formación de imágenes. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen: un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo o una marca de afinidad. En un modo de realización, el marcador es un radiomarcador usado para la formación de imágenes médicas, por ejemplo, Tc99m o I123, o un marcador de espín para la formación de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, IRM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso, hierro, etc. Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su medio natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para la valoración de la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos

terapéuticos.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación.

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

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se trata, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de las metástasis, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o atenuación del estado patológico y la remisión o el pronóstico mejorado. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

Composiciones y procedimientos

Los procedimientos y artículos de fabricación de la presente divulgación usan, o incorporan, una lanzadera de barrera hematoencefálica y/o una proteína de fusión que se une a un R/BHE. El antígeno de R/BHE que se va a usar para la producción o el cribado de una entidad de unión monovalente puede ser, por ejemplo, una forma soluble o una parte de la misma (por ejemplo, el dominio extracelular), que contiene el epítipo deseado. De forma alternativa, o adicionalmente, las células que expresan R/BHE en su superficie celular se pueden usar para generar, o cribar, la entidad de unión monovalente. Otras formas de R/BHE útiles para generar la entidad de unión monovalente serán evidentes para los expertos en la técnica. Los ejemplos de R/BHE en el presente documento incluyen el receptor de transferrina (TfR), el receptor de insulina, el receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF-R), la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y LRP8, y el factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF).

De acuerdo con la presente invención, una entidad "de unión monovalente" contra TfR se selecciona en base a los datos del presente documento que demuestran que dicha entidad de unión monovalente presenta una captación mejorada en el SNC (por ejemplo, en el cerebro). Para identificar dicha entidad de unión, están disponibles diversos ensayos para medir el modo de unión monovalente incluyendo, sin limitación: ensayo de Scatchard y técnica de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, usando BIACORE®) e investigaciones *in vivo* descritas en el presente documento.

La divulgación proporciona un procedimiento para elaborar una entidad de unión monovalente útil para transportar una entidad efectora cerebral tal como, por ejemplo, un fármaco para trastornos neurológicos, a través de la barrera hematoencefálica, que comprende seleccionar una entidad de unión monovalente de un panel de restos de unión monovalente contra un R/BHE porque tiene un modo de unión monovalente para el R/BHE. El modo de unión monovalente garantiza un cruce eficaz de la BHE para determinados R/BHE al no interferir con la clasificación intracelular normal de los receptores.

Para un trastorno neuropático, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un analgésico, incluyendo, pero no limitado a, un analgésico opiáceo/opioide (es decir, morfina, fentanilo, hidrocodona, petidina, metadona, oximorfona, pentazocina, propoxifeno, tramadol, codeína y oxicodona), un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) (es decir, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketorolaco, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, oxaprozina, piroxicam, sulindaco y tolmetina), un corticoesteroide (es decir, cortisona, prednisona, prednisolona, dexametasona, metilprednisolona y triamcinolona), un agente antimigrañoso (es decir, sumatriptina, almotriptán, frovatriptán, sumatriptán, rizatriptán, eletriptán, zolmitriptán, dihidroergotamina, eletriptán y ergotamina), paracetamol, un salicilato (es decir, ácido acetilsalicílico, salicilato de colina, salicilato de magnesio, diflunisal y salsalato), un anticonvulsivo (es decir, carbamazepina, clonazepam, gabapentina, lamotrigina, pregabalina, tiagabina y topiramato), un anestésico (es decir, isoflurano, tricloretileno, halotano, sevoflurano, benzocaína, cloroprocaína, cocaína, ciclometacaína, dimetocaína, propoxicaína, procaína, novocaína, proparacaína, tetracaína, articaína, bupivacaína, carticaína, cincocaína, etidocaína, levobupivacaína, lidocaína, mepivacaína, piperocaína, prilocaína, ropivacaína, trimecaína, saxitoxina y tetrodotoxina), y un inhibidor de cox-2 (es decir, celecoxib, rofecoxib y valdecoxib). Para un trastorno neuropático con afectación por vértigo, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente antivertiginoso, incluyendo, pero no limitado a, meclizina, difenhidramina, prometazina y diazepam. Para un trastorno neuropático con afectación por náuseas, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente antiemético, incluyendo, pero no limitado a, prometazina, clorpromazina, proclorperazina, trimetobenzamida y metoclopramida. Para una enfermedad neurodegenerativa, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es una hormona del crecimiento o factor neurotrófico; los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF),

neurotrofina-4/5, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-2 y otros FGF, neurotrofina (NT)-3, eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF)-alfa, TGF-beta, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), neurturina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, neuregulina, artemina, persefina, interleucinas, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GFR), factor estimulante de colonias de granulocitos (CSF), CSF de granulocitos y macrófagos, netrinas, cardiotrofina-1, factores hedgehog, factor inhibidor de leucemia (LIF), midquina, pleiotrofina, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), netrinas, saposinas, semaforinas y factor de células madre (SCF). Para el cáncer, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es un agente quimioterápico. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo alretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (en especial, bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósidos; criptoficinas (en especial, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo sus análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, lomustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial, caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (véase, por ejemplo, Angew, Chem Intl. Ed. Engl.,33:183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azerasina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolinodoxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromoestanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antisuprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; refuerzo de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (en especial, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDEXIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de paclitaxel en nanopartículas genomanipuladas con albúmina libres de Cremophor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, abreviatura de un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición de agentes quimioterápicos los agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y que están a menudo en forma de tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser las propias hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores por disminución del receptor de estrógenos (ERD); agentes que funcionan inhibiendo o desactivando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida UPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la

producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-midazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIL®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterápicos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleosídico de citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de tratamiento génico, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor dual de molécula pequeña de las tirosina cinasas ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Otro grupo de compuestos que se pueden seleccionar como fármacos neurológicos para el tratamiento o la prevención del cáncer son las inmunoglobulinas antineoplásicas (incluyendo, pero no limitado a, trastuzumab, bevacizumab, alemtumab, cetuximab, gemtuzumab-ozogamicina, ibritumomab-tiuxetán, panitumumab y rituximab). En algunos casos, los anticuerpos junto con un marcador tóxico se pueden usar para dirigirse a y destruir las células deseadas (es decir, las células cancerosas), incluyendo, pero no limitado, tositumomab con un radiomarcador.

Para una enfermedad o trastorno ocular, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un agente oftálmico antiangiogénico (es decir, bevacizumab, ranibizumab y pegaptanib), un agente de glaucoma oftálmico (es decir, carbacol, epinefrina, bromuro de demecario, apraclonidina, brimonidina, brinzolamida, levobunolol, timolol, betaxolol, dorzolamida, bimatoprost, carteolol, metipranolol, dipivefrina, travoprost y latanoprost), un inhibidor de la anhidrasa carbónica (es decir metazolamida y acetazolamida), un antihistamínico oftálmico (es decir, nafazolina, fenilefrina y tetrahidrozolina), un lubricante ocular, un esteroide oftálmico (es decir, fluorometolona, prednisolona, loteprednol, dexametasona, difluprednato, rimexolona, fluocinolona, medrisona y triamcinolona), un anestésico oftálmico (es decir lidocaína, proparacaína y tetracaína), un antiinfeccioso oftálmico (es decir, levofloxacin, gatifloxacin, ciprofloxacino, moxifloxacino, cloranfenicol, bacitracina/polimixina B, sulfacetamida, tobramicina, azitromicina, besifloxacino, norfloxacino, sulfisoxazol, gentamicina, idoxuridina, eritromicina, natamicina, gramicidina, neomicina, ofloxacino, trifuridina, ganciclovir, vidarabina), un agente antiinflamatorio oftálmico (es decir, nepafenaco, ketorolaco, flurbiprofeno, suprofen, ciclosporina, triamcinolona, diclofenaco y bromfenaco), y un antihistamínico o descongestivo oftálmico (es decir, ketotifeno, olopatadina, epinastina, nafazolina, cromolina, tetrahidrozolina, pemirolast, bepotastina, nafazolina, fenilefrina, nedocromilo, lodoxamida, fenilefrina, emedastina y azelastina). Para un trastorno convulsivo, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un anticonvulsivo o antiépiléptico, incluyendo, pero no limitado a, anticonvulsivos de barbitúricos (es decir, primidona, metarbital, mefobarbital, alobarbital, amobarbital, aprobarbital, alfenal, barbital, bralobarbital y fenobarbital), anticonvulsivos de benzodiazepina (es decir, diazepam, clonazepam y lorazepam), anticonvulsivos de carbamato es decir, felbamato), anticonvulsivos inhibidores de anhidrasa carbónica (es decir, acetazolamida, topiramato y zonisamida), anticonvulsivos de dibenzazepina (es decir rufinamida, carbamazepina y oxcarbazepina), anticonvulsivos derivados de ácidos grasos (es decir, divalproex y ácido valproico), análogos del ácido gamma-aminobutírico (es decir, pregabalina, gabapentina y vigabatrina), inhibidores de la recaptación del ácido gamma-aminobutírico (es decir, tiagabina), inhibidores de la transaminasa del ácido gamma-aminobutírico (es decir, vigatrabina), anticonvulsivos de hidantoína (es decir, fenitoína, etotoína, fosfenitoína y mefenitoína), anticonvulsivos variados (es decir, lacosamida y sulfato de magnesio), progestinas (es decir, progesterona), anticonvulsivos de oxazolidindiona (es decir, parametadiona y trimetadiona), anticonvulsivos de pirrolidina (es decir, levetiracetam), anticonvulsivos de succinimida (por ejemplo, etosuximida y metosuximida), anticonvulsivos de triazina (es decir, lamotrigina) y anticonvulsivos de urea (es decir, fenacemida y feneturida).

Para una enfermedad de almacenamiento lisosómico, se puede seleccionar un fármaco neurológico que es en sí mismo o imita de otro modo la actividad de la enzima que está alterada en la enfermedad. Los ejemplos de enzimas recombinantes para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico incluyen, pero no se limitan a, los expuestos en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0142141 (es decir, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-sulfatasa, alfa-N-acetilglucosaminidasa, N-acetilgalactosamino-6-sulfatasa, beta-galactosidasa, arilsulfatasa B, beta-glucuronidasa, alfa-glucosidasa ácida, glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida, beta-galactocerebrosidasa, beta-galactosidasa, arilsulfatasa A, ceramidasa ácida, aspartoacilasa, palmitoilproteína tioesterasa 1 y tripeptidilamino peptidasa 1).

Para la amiloidosis, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluya, pero no se limite a, un anticuerpo u otra molécula de unión (incluyendo, pero no limitado a, una molécula pequeña, un péptido, un aptámero u otro producto de unión a proteína) que se une específicamente a una diana seleccionada de: beta-secretasa, tau, presenilina, proteína precursora de amiloide o partes de la misma, péptido beta-amiloide u oligómeros o fibrillas del mismo, receptor de muerte 6 (DR6), receptor para productos finales de glucación avanzada (RAGE), parkina y huntingtina; un inhibidor de la colinesterasa (es decir, galantamina, donepezilo, rivastigmina y tacrina); un antagonista del receptor de NMDA (es decir, memantina), un producto que disminuye las monoaminas (es decir, tetrabenazina); un mesilato ergoloide; un agente de antiparkinsonismo anticolinérgico (es decir, prociclidina, difenhidramina, trihexifenidilo, benztropina, biperideno y trihexifenidilo); un agente de antiparkinsonismo dopaminérgico (es decir, entacapona, selegilina,

pramipexol, bromocriptina, rotigotina, selegilina, ropinirol, rasagilina, apomorfina, carbidopa, levodopa, pergolida, tolcapona y amantadina); una tetrabenazina; un antiinflamatorio (incluyendo, pero no limitado a, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (es decir, indometicina y otros compuestos enumerados anteriormente); una hormona (es decir, estrógeno, progesterona y leuprolida); una vitamina (es decir, folato y nicotinamida); una dimebolina; una homotaurina (es decir, ácido 3-aminopropanosulfónico; 3-APS); un modulador de la actividad de los receptores de la serotonina (es decir, xaliprodeno); un interferón y un glucocorticoide.

Para una enfermedad vírica o microbiana, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluya, pero no se limite a, un compuesto antivírico (incluyendo, pero no limitado a, un antivírico de adamantano (es decir, rimantadina y amantadina), un interferón antivírico (es decir, peginterferón alfa-2b), un antagonista de los receptores de quimiocina (es decir, maraviroc), un inhibidor de la transferencia de cadenas de integrasa (es decir, raltegravir), un inhibidor de la neuraminidasa (es decir, oseltamivir y zanamivir), un inhibidor no nucleosídico de la retrotranscriptasa (es decir, efavirenz, etravirina, delavirdina y nevirapina), inhibidores nucleosídicos de la retrotranscriptasa (tenofovir, abacavir, lamivudina, zidovudina, estavudina, entecavir, emtricitabina, adefovir, zalcitabina, telbivudina y didanosina), un inhibidor de la proteasa (es decir, darunavir, atazanavir, fosemprenavir, tipranavir, ritonavir, nelfmavir, amprenavir, indinavir y saquinavir), un nucleósido purínico (es decir, valaciclovir, famciclovir, aciclovir, ribavirina, ganciclovir, valganciclovir y cidofovir) y un antivírico variado (es decir, enfuvirtida, foscarnet, palivizumab y fomivirsén)), un antibiótico (incluyendo, pero no limitado a, aminopenicilina (es decir, amoxicilina, ampicilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucoxacilina, temocilina, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina y bacampicilina), una cefalosporina (es decir, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefamandol, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidina, cefadroxilo, cefradina, loracarbef, cefotetán, cefuroxima, cefprozilo, cefaclor y cefoxitina), un carbapenémico/penémico (es decir, imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem y doripenem), un monobactámico (es decir, aztreonam, tigemonam, norcardicina A y tabtoxinina-beta lactámico), un inhibidor de la betalactamasa (es decir, ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam) junto con otro antibiótico betalactámico, un aminoglucósido (es decir, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina y paromomicina), una ansamicina (es decir, geldanamina y herbimicina), un carbacefémico (es decir, loracarbef), un glucopéptido (es decir, teicoplanina y vancomicina), un macrólido (es decir, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espectinomina), un monobactámico (es decir, aztreonam), una quinolona (es decir, ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, ofloxacino, trovafloxacino, grepafloxacino, esparfloxacino y temafloxacino), una sulfonamida (es decir, mafenamida, sulfonamidocrisoidina, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, trimetoprima, trimetoprima y sulfametoxazol), una tetraciclina (es decir, tetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina y oxitetraciclina), un antibiótico antineoplásico o citotóxico (es decir, doxorubicina, mitoxantrona, bleomicina, daunorubicina, dactinomina, epirubicina, idarubicina, plicamicina, mitomicina, pentostatina y valrubicina) y un compuesto antibacteriano variado (es decir, bacitracina, colistina y polimixina B)), un antifúngico (es decir, metronidazol, nitazoxanida, imidazol, cloroquina, yodoquinol y paromomicina) y un antiparasitario (incluyendo, pero no limitado a, quinina, cloroquina, amodiaquina, pirimetamina, sulfadoxina, proguanil, mefloquina, atovacuona, primaquina, artemesinina, halofantrina, doxiciclina, clindamicina, mebendazol, pamoato de pirantel, tiabendazol, dietilcarbamazina, ivermectina, rifampina, anfotericina B, melarsoprol, efonitina y albendazol). Para la isquemia, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluye, pero no se limita a, un trombolítico (es decir, urocinasa, alteplasa, reteplasa y tenecteplasa), un inhibidor de la agregación de las plaquetas (es decir, ácido acetilsalicílico, cilostazol, clopidogrel, prasugrel y dipiridamol), una estatina (es decir, lovastatina, pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina, atorvastatina, simvastatina, cerivastatina y pitavastatina) y un compuesto para mejorar el flujo sanguíneo o la flexibilidad vascular, incluyendo, por ejemplo, medicamentos para la tensión arterial.

Para un trastorno del comportamiento, se puede seleccionar un fármaco neurológico de un compuesto modificador del comportamiento incluyendo, pero no limitado a, un antipsicótico atípico (es decir, risperidona, olanzapina, apripiprazol, quetiapina, paliperidona, asenapina, clozapina, iloperidona y ziprasidona), un antipsicótico de fenotiazina (es decir, proclorperazina, clorpromazina, flufenazina, perfenazina, trifluoperazina, tioridazina y mesoridazina), un tioxanteno (es decir, tiotixeno), un antipsicótico variado (es decir, pimozida, litio, molindona, haloperidol y loxapina), un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (es decir, citalopram, escitalopram, paroxetina, fluoxetina y sertralina), un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (es decir, duloxetina, venlafaxina, desvenlafaxina), un antidepresivo tricíclico (es decir, doxepina, clomipramina, amoxapina, nortriptilina, amitriptilina, trimipramina, imipramina, protriptilina y desipramina), un antidepresivo tetracíclico (es decir, mirtazapina y maprotilina), un antidepresivo de fenilpiperazina (es decir, trazodona y nefazodona), un inhibidor de la monoaminoxidasa (es decir, isocarboxazida, fenelzina, selegilina y tranilcipromina), una benzodiazepina (es decir, alprazolam, estazolam, flurazepam, clonazepam, lorazepam y diazepam), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (es decir, bupropión), un estimulante del SNC (es decir, fentermina, dietilpropión, metanfetamina, dextroanfetamina, amfetamina, metilfenidato, dexmetilfenidato, lisdexanfetamina, modafnilo, pemolina, fendimetrazina, benzofetamina, fendimetrazina, armodafnilo, dietilpropión, cafeína, atomoxetina, doxapram y mazindol), un ansiolítico/sedante/hipnótico (incluyendo, pero no limitado a, un barbitúrico (es decir, secobarbital, fenobarbital y mefobarbital), una benzodiazepina (como se describe anteriormente) y un ansiolítico/sedante/hipnótico variado (es decir, difenhidramina, oxibato de sodio, etcleplón, hidroxyzina, hidrato de cloral, aolpidem, buspirona, doxepina, eszopiclona, ramelteón, meprobamato y etclorvinol)), una secretina (véase, por ejemplo, Ratliff-Schaub *et al.* Autism 9: 256-265 (2005)), un péptido opioide (véase, por ejemplo, Cowen *et al.*, J. Neurochem. 89:273-285 (2004)) y un neuropéptido (véase, por ejemplo, Hethwa *et al.* Am. J. Physiol. 289: E301-305 (2005)).

Para la inflamación del SNC, se puede seleccionar un fármaco neurológico que aborda la inflamación en sí misma (es decir, un agente antiinflamatorio no esteroideo tal como ibuprofeno o naproxeno), o uno que trata la causa subyacente de la inflamación (es decir, un agente antivírico o antineoplásico).

5 En otro modo de realización, la entidad efectora cerebral es un anticuerpo inalterado o de longitud completa. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos inalterados se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de anticuerpos inalterados: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, 10 IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Son bien conocidas las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas. En un modo de realización, el anticuerpo inalterado carece de función efectora.

15 Las técnicas para la generación de anticuerpos son conocidas y se proporcionan ejemplos anteriormente en la sección de definiciones de este documento. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

20 Están disponibles diversas técnicas para determinar la unión de la entidad de unión monovalente al R/BHE. Uno de dichos ensayos es un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para confirmar la capacidad de unirse a R/BHE humano (y antígeno cerebral). De acuerdo con este ensayo, se incuban placas recubiertas con antígeno (por ejemplo, R/BHE recombinante) con una muestra que comprende la entidad de unión monovalente hacia el R/BHE y se determina la unión de la entidad de unión monovalente al antígeno de interés.

25 En un aspecto, se somete a prueba la entidad de unión monovalente de la invención para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunoelctrotransferencia, etc.

30 En un aspecto, se somete a prueba la entidad de unión monovalente de la invención para determinar su actividad de unión a antígeno único hacia un R/BHE usando la cartografía de epítomos de la determinación de la estructura de rayos X.

35 Los ensayos para evaluar la captación de la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado administrado sistémicamente y otra actividad biológica de la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado se pueden realizar como se divulga en los ejemplos o como se conoce para la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de interés. Se puede usar también la medición de la concentración dentro del espacio del parénquima del SNC usando, por ejemplo, microdiálisis o el procedimiento de disminución capilar combinado con ELISA o mediciones de radioactividad de la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado marcados.

40 **Formulaciones farmacéuticas**

Las formulaciones terapéuticas de la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado usadas de acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición, Osol, A., (ed.) (1980)), 45 en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; 50 resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; 55 complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario, opcionalmente aquellos que tienen actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. El 60 tipo y las cantidades eficaces de dichos medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad de lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado presente en la formulación y de los parámetros clínicos de los sujetos. A continuación, se analizan ejemplos de dichos medicamentos.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de 65 coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por

ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980).

- 5 Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -L-glutamato de etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

- 15 Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles. En un modo de realización, la formulación es isotónica.

- 20 La lanzadera de barrera hematoencefálica y/o el conjugado de la invención se pueden utilizar en una variedad de procedimientos *in vivo*. Por ejemplo, la divulgación proporciona un procedimiento para transportar un compuesto terapéutico a través de la BHE que comprende exponer la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o el conjugado a la BHE, de modo que la entidad de unión monovalente transporta el compuesto terapéutico acoplado a la misma a través de la BHE. En otro ejemplo, la divulgación proporciona un procedimiento para transportar un fármaco para trastornos neurológicos a través de la BHE que comprende exponer la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado a la BHE, de modo que la entidad de unión monovalente transporta el fármaco para trastornos neurológicos acoplado a la misma a través de la BHE. En un modo de realización, la BHE en esta ocasión está en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), por ejemplo, uno que tiene un trastorno neurológico, incluyendo, sin limitación: enfermedad de Alzheimer (EA), apoplejía, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer, lesión cerebral traumática, etc.

- 30 En un modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona de: una neuropatía, amiloidosis, cáncer (por ejemplo, que afecta al SNC o al cerebro), una enfermedad o trastorno ocular, una infección vírica o microbiana, inflamación (por ejemplo, del SNC o el cerebro), isquemia, enfermedad neurodegenerativa, convulsiones, trastornos del comportamiento, enfermedad de almacenamiento lisosómico, etc.

- 35 Los trastornos neuropáticos son enfermedades o anomalías del sistema nervioso que se caracterizan por señales nerviosas inapropiadas o no controladas o falta de ellas, e incluyen, pero no se limitan a, dolor crónico (incluyendo dolor nociceptivo), dolor causado por una lesión en tejidos corporales, incluyendo dolor relacionado con el cáncer, dolor neuropático (dolor causado por anomalías en los nervios, la médula espinal o el cerebro) y dolor psicógeno (en su totalidad o en su mayoría relacionado con un trastorno psicológico), cefalea, migraña, neuropatía, y síntomas y síndromes que a menudo acompañan a dichos trastornos neuropáticos tales como vértigo o náuseas.

- 45 Las amiloidosis son un grupo de enfermedades y trastornos asociados a los depósitos proteicos extracelulares en el SNC, incluyendo, pero no limitado a, amiloidosis secundaria, amiloidosis senil, enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve (DCL), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo Guam de parkinsonismo-demencia, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, encefalopatía esponjiforme transmisible, demencia relacionada con el VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis con cuerpos de inclusión (MCI) y las enfermedades oculares relacionadas con el depósito de beta-amiloide (es decir, degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusas y cataratas).

- 50 Los cánceres del SNC se caracterizan por la proliferación anómala de una o más células del SNC (es decir, una célula neural) e incluyen, pero no se limitan a, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, astrocitoma, neuroma acústico, condroma, oligodendroglioma, meduloblastomas, ganglioglioma, schwannoma, neurofibroma, neuroblastoma y tumores extradural, intramedular o intradural.

- 55 Las infecciones víricas o microbianas del SNC incluyen, pero no se limitan a, infecciones por virus (es decir, gripe, VIH, virus de la polio, rubéola), bacterias (es decir, *Neisseria* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *E. coli*, *S. aureus*, *Pneumococcus* sp., *Meningococcus* sp., *Haemophilus* sp. y *Mycobacterium tuberculosis*) y otros microorganismos tales como hongos (es decir, levaduras, *Cryptococcus neoformans*), parásitos (es decir, *Toxoplasma gondii*) o amebas que dan como resultado fisiopatologías del SNC incluyendo, pero no limitado a, meningitis, encefalitis, mielitis, vasculitis y absceso, que pueden ser agudas o crónicas. La inflamación del SNC es la inflamación que se produce por una lesión en el SNC, que puede ser una lesión física (es decir, debida a un accidente, cirugía, traumatismo cerebral, lesión de la médula espinal, conmoción cerebral) o una lesión debida a o en relación con una o más de otras enfermedades o trastornos del SNC (es decir, absceso, cáncer, infección vírica o microbiana).

- 65 La isquemia del SNC, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de trastornos relacionados con el

flujo de sangre o comportamiento vascular anómalo en el cerebro o a las causas de los mismos, e incluye, pero no se limita: isquemia cerebral focal, isquemia cerebral global, apoplejía (es decir, hemorragia subaracnoidea y hemorragia intracerebral) y aneurisma.

5 Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la pérdida de función o muerte de células neuronales en el SNC, e incluyen, pero no se limitan a: adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, degeneración causada por o asociada a una amiloidosis, ataxia de Friedreich, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de Kennedy, atrofia de múltiples sistemas, esclerosis múltiple, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, atrofia muscular espinal, mielitis transversa, enfermedad de Refsum y ataxia espinocerebelosa.

15 Las enfermedades y trastornos de convulsiones del SNC implican una conducción eléctrica inapropiada y/o anómala en el SNC, e incluyen, pero no se limitan a: epilepsia (es decir, crisis de ausencia, convulsiones atónicas, epilepsia rolándica benigna, ausencia de la niñez, convulsiones clónicas, convulsiones parciales complejas, epilepsia del lóbulo frontal, convulsiones febriles, espasmos infantiles, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia de ausencia juvenil, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Dravet, síndrome Otahara, síndrome de West, convulsiones mioclónicas, trastornos mitocondriales, epilepsias mioclónicas progresivas, convulsiones psicógenas, epilepsia refleja, síndrome de Rasmussen, convulsiones parciales simples, convulsiones generalizadas secundarias, epilepsia del lóbulo temporal, convulsiones toniclónicas, convulsiones tónicas, convulsiones psicomotoras, epilepsia límbica, convulsiones de inicio parcial, convulsiones de inicio generalizado, estado epiléptico, epilepsia abdominal, convulsiones acinéticas, convulsiones autonómicas, mioclonía bilateral masiva, epilepsia catamenial, convulsiones de gota, convulsiones emocionales, convulsiones focales, convulsiones gelásticas, marcha jacksoniana, enfermedad de Lafora, convulsiones motoras, convulsiones multifocales, convulsiones nocturnas, convulsiones fotosensibles, pseudo-convulsiones, convulsiones sensoriales, convulsiones sutiles, convulsiones de Sylvan, convulsiones por abstinencia y convulsiones reflejas visuales).

30 Los trastornos del comportamiento son trastornos del SNC caracterizados por un comportamiento anómalo por parte del sujeto afligido e incluyen, pero no se limitan a: trastornos del sueño (es decir, insomnio, sonambulismo, terrores nocturnos, trastornos del sueño del ritmo circadiano y narcolepsia), trastornos del estado de ánimo (es decir, depresión, depresión suicida, ansiedad, trastornos afectivos crónicos, fobias, ataques de pánico, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastorno por déficit de atención (TDA), síndrome de fatiga crónica, agorafobia, trastorno de estrés postraumático, trastorno bipolar), trastornos alimentarios (es decir, anorexia o bulimia), psicosis, trastornos de comportamiento del desarrollo (es decir, autismo, síndrome de Rett, síndrome de Asperger), trastornos de la personalidad y trastornos psicóticos (es decir, esquizofrenia, trastorno delirante y similares).

40 Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son trastornos metabólicos que, en algunos casos, están asociados al SNC o tienen síntomas específicos del SNC; dichos trastornos incluyen, pero no se limitan a: enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, mucopolisacaridosis (tipos I, II, III, IV, V, VI y VII), enfermedad de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis GM1, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Farber, leucodistrofia de Canavan y lipofuscinosis ceroides neuronal tipo 1 y 2, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Pompe y enfermedad de Krabbe.

45 En un aspecto, se proporciona la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención para su uso como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). En determinados modos de realización, se proporciona la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados modos de realización, la invención proporciona la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención para su uso en un procedimiento para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es opcionalmente un ser humano.

55 La lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es un agente terapéutico eficaz para tratar un trastorno neurológico igual o diferente al trastorno neurológico para el que la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado se está empleando para tratar. Los agentes terapéuticos adicionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a: los diversos fármacos neurológicos descritos anteriormente, inhibidores de la colinesterasa (tales como donepezilo, galantamina, rovastigmina y tacrina), antagonistas del receptor de NMDA (tales como memantina), inhibidores de la agregación del péptido beta amiloide, antioxidantes, moduladores de γ -secretasa, factor de crecimiento nervioso (FCN), tratamiento génico con NGF o similar, agonistas de PPAR γ , inhibidores de la HMS-CoA reductasa (estatinas), ampakinas, bloqueadores del canal de calcio, antagonistas del receptor GABA, inhibidores de la glucógeno sintasa cinasa, inmunoglobulina intravenosa, agonistas del receptor muscarínico, moduladores de receptores nicotínicos,

inmunización activa o pasiva con péptido beta amiloide, inhibidores de fosfodiesterasa, antagonistas del receptor de serotonina y anticuerpos anti-péptido beta amiloide. En determinados modos de realización, se selecciona al menos un agente terapéutico adicional por su capacidad para mitigar uno o más efectos secundarios del fármaco neurológico.

5 Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración de la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. Las lanzaderas de barrera hematoencefálica y/o conjugados de la invención también se pueden usar en combinación con
10 otros tratamientos de intervención tales como, pero no limitados a, radioterapia, tratamiento del comportamiento u otros tratamientos conocidos en la técnica y apropiados para el trastorno neurológico que se va a tratar o prevenir. La lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, para el tratamiento local y administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen
15 administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea.

La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento, se contemplan diversas pautas posológicas, incluyendo, pero no limitado a, administraciones monvalentes o múltiples en diversos puntos temporales, administración con inyección intravenosa rápida e infusión por pulsos.
20

La lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugados de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una manera consecuente con la buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de administración y otros factores conocidos por los médicos. La lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugados de la invención no necesitan formularse, pero opcionalmente se formulan, con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las rutas de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier ruta que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.
25
30
35

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención (cuando se usa por sí solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de su respuesta a la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado, y del criterio del médico especialista. La lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg) de lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado puede ser una dosificación inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o múltiples continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se mantendría el tratamiento hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguido de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La evolución de este tratamiento se sigue fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.
40
45
50
55

Artículos de fabricación

60 En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento y/o la prevención de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o combinada con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón
65

perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende una lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende otro agente citotóxico o terapéutico de otro modo. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

El artículo de fabricación comprende además opcionalmente un prospecto del envase con instrucciones para el tratamiento de un trastorno neurológico en un sujeto, en el que las instrucciones indican que el tratamiento con la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado que se divulga en el presente documento trata el trastorno neurológico, y opcionalmente indica que la lanzadera de barrera hematoencefálica y/o conjugado tiene una captación mejorada a través de la BHE debido al modo de unión monovalente al R/BHE.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de los plásmidos de expresión

Descripción del plásmido de expresión de mamífero básico/estándar

Las proteínas deseadas se expresaron mediante transfección transitoria de células renales embrionarias humanas (HEK 293). Para la expresión de un gen/proteína deseado (por ejemplo, proteína multimérica anticuerpo-Fab) se usó una unidad de transcripción que comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina (SS),
- un gen/proteína que se va a expresar (por ejemplo, cadena pesada del anticuerpo de longitud completa), y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA de BGH).

Además de la unidad de expresión/casete que incluye el gen que se desea expresar, el plásmido de expresión de mamífero básico/estándar contiene:

- un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
- un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

Se construyeron plásmidos de expresión que codifican los siguientes polipéptidos/proteínas de fusión de anticuerpo-scFab:

Mab31-scFab (8D3) tetravalente (Fig. 1C) (Mab31 = anticuerpo monoclonal humano que reconoce Abeta. INN de Mab 31 = Gantenerumab)

Cadena pesada (10132_pPM284_Mab31(IgG1)-(G₄S)₄-VL-Ck-(G₄S)₆-GG-VH-CH1) (SEQ ID. NO 1):

Composición de la proteína de fusión de cadena pesada Mab31-scFab (8D3):

- Cadena pesada de IgG1 humana de Mab31 sin Lys C-terminal
- Conector de glicina-serina
- Variante del dominio variable de cadena ligera (VL) (L596V y L598I) del anticuerpo antitransferrina 8D3 de ratón (Boado, RJ Zhang, Y. Wang, Y y Pardridge, WM, Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)
- Cadena ligera C-kappa humana
- Conector de glicina-serina

- Dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo antitransferrina 8D3 de ratón (Boado, RJ Zhang, Y. Wang, Y y Pardridge, WM, Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)

- 5 • Dominio de cadena pesada CH3 de IgG1 humana

Cadena ligera (5170-VL-Mab31-BsmI-L2-Neo-BGHpA) (SEQ ID. NO 2)

Composición de la cadena ligera de Mab31

- 10 - Cadena ligera C-kappa humana de Mab31

Mab31-scFab trivalente (8D3) (Fig. 1B)

- 15 Cadena pesada de botón (10134_pPM287_Mab31(IgG1)_knob_SS_-(G4S)₄-VL-Ck-(G4S)₆-GG-VH-CH1) (SEQ ID. NO 3)

Composición del botón de proteína de fusión de cadena pesada de Mab31-scFab (8D3)

- 20 • Cadena pesada de IgG1 humana de Mab31 sin Lys C-terminal que contiene la mutación de botón de CH3 T366W y la mutación S354C para la formación de un puente disulfuro adicional

- Conector de glicina-serina

- 25 • Variante del dominio variable de cadena ligera (VL) (L596V y L598I) del anticuerpo antitransferrina 8D3 de ratón (Boado, RJ Zhang, Y. Wang, Y y Pardridge, WM, Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)

- Cadena ligera C-kappa humana

- 30 • Conector de glicina-serina

- Dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo antitransferrina 8D3 de ratón (Boado, RJ Zhang, Y. Wang, Y y Pardridge, WM, Biotechnology and Bioengineering (2009) 102, 1251-1258)

- 35 • Dominio de cadena pesada CH3 de IgG1 humana

Cadena pesada de ojal (10133_pPM286_Mab31(IgG1)_hole_SS) (SEQ ID. NO 4)

Composición del ojal de proteína de fusión de cadena pesada de Mab31

- 40 • Cadena pesada de IgG1 humana de Mab31 que contiene las mutaciones de ojal de CH3 T366S, Y407V y L368A y la mutación Y349C para la formación de un puente disulfuro adicional

Cadena ligera (5170-VL-Mab31-BsmI-L2-Neo-BGHpA) (SEQ ID. NO 2)

45 Composición de la cadena ligera de Mab31

- Cadena ligera C-kappa humana de Mab31

50 **Ejemplo 2: Purificación de construcciones únicas y dobles sFab y dFab de Mab31-scFab**

Las cadenas de anticuerpo se generaron mediante transfección transitoria de células HEK293 (derivadas de línea de células de riñón embrionario 293 humanas) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección, se usó el reactivo de transfección "293-Fectin" (Invitrogen). Las cadenas de anticuerpos se expresaron a partir de dos (Mab31-scFab tetravalente (8D3)) o tres (Mab31-scFab trivalente (8D3)) plásmidos diferentes que codificaban la cadena pesada de Mab31-scFab (8D3) tetravalente y la cadena ligera correspondiente de Mab31, o las cadenas pesadas de botón y ojal de Mab31-scFab (8D3) trivalente y la cadena ligera correspondiente de Mab31, respectivamente. Los dos o tres plásmidos se usaron a una relación de plásmido equimolar en la transfección. Las transfecciones se realizaron como se especificaba en las instrucciones del fabricante. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular que contenían proteínas de fusión de anticuerpo siete días después de la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron congelados hasta su purificación.

Las proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares filtrados. Los sobrenadantes se aplicaron a una columna de proteína A Sepharose (GE Healthcare) y se lavaron con PBS pH 7,4. La elución de los anticuerpos se logró con tampón Citate 100 mM a pH 3,0 seguido de neutralización inmediata de la muestra a pH 6,5. Después de la concentración, la proteína agregada y otros subproductos se separaron de los anticuerpos monoméricos mediante

cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; GE Healthcare) en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Cada fracción individual se analizó en SEC analítica (TSK G3000SWXL) y en un sistema de electroforesis capilar basado en chip (CE-SDS, LabChipGX, Caliper) para la cuantificación de moléculas ensambladas de forma incompleta y otros subproductos. Se mezclaron las fracciones de anticuerpos monoméricos sin subproductos. Después de la concentración usando un concentrador centrífugo MILLIPOREAmicon Ultra (corte de peso molecular 30), la proteína se almacenó a -80 °C. La caracterización analítica del producto final se realizó mediante determinación de proteínas por UV, CE-SDS, cromatografía de exclusión por tamaño, espectrometría de masas y también mediante determinación de endotoxinas.

10 **Ejemplo 3: Datos de unión por ELISA de construcciones de scFab único (sFab) y scFab doble (dFab)**

15 Se valoró la unión de construcciones de mAb31-8D3 al receptor de transferrina de ratón (mTfR) mediante ELISA indirecto. Con este fin, se recubrió mTfR recombinante (dominio extracelular; Sino Biological) sobre una placa de microtitulación Maxisorb (Nunc) a 1 µg/ml en PBS a 4 °C durante la noche. Después de bloquear en proteína C/PBS al 1 % (tampón de bloqueo; Roche) durante 1 h a TA y 4 lavados con Tween-20/PBS al 1 % (tampón de lavado), se añadieron construcciones de mAb31-8D3 a los pocillos a concentraciones entre 0,01 y 150 nM en tampón de bloqueo y se incubaron durante 1 h a TA. Después de 4 etapas de lavado, se detectaron construcciones mediante la adición de anticuerpo contra IgG humana-HRP (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:10 000 en tampón de bloqueo (1 TA), seguido de 6 lavados e incubación en TMB (Sigma). La absorbancia se leyó a 450 nm después de detener el desarrollo del color con HCl 1 N.

La fig. 3 muestra que la unión del mAb31-8D3-dFab bivalente a mTfR es similar a la de la IgG 8D3, mientras que la construcción monovalente mAb31-8D3-sFab muestra una afinidad reducida.

25 La funcionalidad de mAb31 se confirmó por ELISA. Brevemente, se recubrió Abeta (1-40) a 7 µg/ml en PBS sobre placas Maxisorb durante 3 días a 37 °C para producir Abeta fibrilar, a continuación se secó durante 3 h a TA. La placa se bloqueó con proteína C al 1 % y RSA al 0,1 % en PBS (tampón de bloqueo) durante 1 h a TA, se lavó a continuación una vez con tampón de lavado. Se añadieron construcciones de mAb31a concentraciones de hasta 100 nM en tampón de bloqueo y se incubaron a 4 °C durante la noche. Después de 4 etapas de lavado, se detectaron las construcciones como se indicó anteriormente.

La fig. 4 muestra que ambas construcciones de mAb31-8D3 (sFab y dFab) se unen con una afinidad similar a la de mAb31 no modificado a fibrillas de Abeta inmovilizadas.

35 **Ejemplo 4: Solo las construcciones de scFab único atraviesan la BHE y decoran las placas.**

Seccionamiento cerebral y tinción inmunohistoquímica:

40 Se prepararon cerebros después de perfusión con PBS y se cortaron criosecciones sagitales a entre ~1,92 y 1,68 milímetros laterales de acuerdo con el atlas cerebral de Paxinos y Franklin. Se seccionaron los cerebros a un grosor nominal de 20 micrómetros a -15 °C usando un criostato Leica CM3050 S y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio preenfriados (Superfrost plus, Menzel, Alemania). Para cada cerebro, se depositaron tres secciones espaciadas 80 micrómetros sobre el mismo portaobjetos.

45 Se rehidrataron las secciones en PBS durante 5 minutos, seguido de una inmersión con acetona al 100 % preenfriada a -20 °C durante 2 min. Todas las etapas adicionales se realizaron a temperatura ambiente. Se lavaron los portaobjetos con secciones de cerebro con PBS, pH 7,4 y bloqueo de sitios de unión inespecíficos mediante incubación secuencial en Ultra V block (LabVision) durante 5 minutos, seguido de lavado con PBS e incubación en solución Power Block (BioGenex) con suero de cabra normal al 2 % en PBS durante 20 min. Se incubaron los portaobjetos directamente con el anticuerpo secundario, un anticuerpo de cabra contra IgG humana purificado por afinidad (específico de cadenas pesadas y ligeras) conjugado con el tinte Alexa Fluor 555 (n.º A-21433, lote 54699A, Molecular Probes) a una concentración de 20 microg/ml en suero de cabra normal al 2 % en PBS, pH 7,4 durante 1 hora. Después de un lavado exhaustivo con PBS, se valoró la localización de la placa mediante un doble marcado de las placas de Abeta mediante incubación con BAP-2, un anticuerpo monoclonal murino de Roche propio contra Abeta conjugado con el tinte Alexa Fluor 488 a 0,5 microg/ml durante 1 hora en PBS con solución Power Block (BioGenex) y suero normal de oveja al 10 %. Después del lavado con PBS, se redujo la autofluorescencia de la lipofuscina mediante inactivación por incubación en CuSO₄ 4 mM en acetato de amonio 50 mM, pH 5 durante 30 minutos. Después de enjuagar los portaobjetos con agua doblemente destilada, se incluyeron los portaobjetos con Confocal Matrix (Micro Tech Lab, Austria).

60 Microscopia confocal

65 Se tomaron tres imágenes de cada sección del cerebro de cada ratón PS2APP con regiones que contienen placa en la corteza frontal (región de la corteza motora primaria). Las imágenes se grabaron con un sistema confocal Leica TCS SP5 con una configuración de orificio de 1 Airy.

Se capturaron las placas inmunomarcadas con tintes Alexa Fluor 488 en las mismas condiciones espectrales (una excitación de 488 nm y una emisión de paso de banda de 500-554 nm) con ganancia y compensación del fotomultiplicador ajustadas (típicamente, 770 V y -0 % respectivamente) a una potencia de láser de un 30 %.

5 Se registraron los anticuerpos secundarios de Alexa Fluor 555 unidos en la superficie accesible de las secciones de tejido en la línea de láser de excitación de 561 nm en una ventana que varía de 570 a 725 nm y cubre el intervalo de longitud de onda de emisión del anticuerpo de detección aplicado. Se mantuvieron constantes las configuraciones de los instrumentos para las adquisiciones de imágenes para permitir mediciones de intensidad comparativa para los anticuerpos anti-A β humanos sometidos a prueba; en particular, potencia de láser, velocidad de barrido, ganancia y compensación. La potencia de láser se estableció en un 30 % y las configuraciones para la ganancia de PMT fueron típicamente de 850 V y una compensación nominal de un 0 %. Esto posibilitó la visualización de placas tanto tenue como fuertemente teñidas con la misma configuración. La frecuencia de adquisición fue de 400 Hz.

15 Se registraron los barridos confocales como capas ópticas únicas con un objetivo UV HCX PL APO 20x 0,7 IMM en agua, a una resolución de 512 \times 512 píxeles y se controló interactivamente la profundidad de medición óptica en el eje vertical para garantizar la formación de imágenes dentro de la sección de tejido. Se tomaron imágenes de las placas de amiloide localizadas en las capas 2-5 de la corteza frontal y se cuantificaron las intensidades fluorescentes.

20 Análisis estadístico

Se visualizaron las regiones inmunopositivas como imágenes TIFF y se procesaron para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia y el área (medida en píxeles) con ImageJ versión 1.45 (NIH). Para la cuantificación, se restaron intensidades de fondo de 5 en cada imagen y se filtraron las regiones positivas menores de 5 píxeles cuadrados. Se determinó la intensidad de fluorescencia total de las isosuperficies seleccionadas como la suma de las intensidades de las regiones positivas individuales únicas y se calculó la intensidad media de píxeles dividiendo la intensidad total entre el número de píxeles analizados.

30 Se calcularon los valores medios y las desviaciones estándar con Microsoft Excel (Redmond/WA, EE. UU.) a partir de todas las isosuperficies medidas obtenidas de nueve imágenes tomadas de tres secciones diferentes para cada animal. El análisis estadístico se realizó usando la prueba de la *t* de Student para la comparación de grupos o una prueba de Mann-Whitney.

35 Se inyectaron 10 mg/ml de mAb31 (construcción de la fig. 1A), 13,3 mg/kg de sFab-mAb31 1 (construcción de la fig. 1B) y 16,7 mg/kg de dFab-mAb31 (construcción de la fig. 1C) en la cola por ruta intravenosa en ratones, y después de 8 horas se perfundió el cerebro con PBS. Se prepararon las secciones como se describe anteriormente y se tiñeron con anticuerpo de cabra contra IgG humana. Para la construcción de mAb31, casi no se detectó señal específica (Fig. 4A). Para el sFab-mAb31, se detectó una extensa tinción tanto de la placa como de los capilares (Fig. 4B), mientras que en el dFab-mAb31 solo se detectó tinción de los capilares (Fig. 4C). Esto mostró claramente que un modo de unión monovalente (sFab-mAb31) al receptor de transferrina es mucho más eficaz para llevar la construcción a través de las células endoteliales cerebrales en la BHE. La cuantificación de la molécula de unión bivalente (dFab-mAb31) se muestra en la fig. 5. Los datos muestran que no hay un aumento en la decoración de la placa para la construcción de dFab-mAb31, solo hay un aumento en la intensidad total debido a la acumulación capilar de la construcción.

45 **Ejemplo 5: Cuantificación de las exposiciones cerebrales con una construcción de scFab único**

El procedimiento experimental se describe en el ejemplo 4. Se muestra la cuantificación de la exposición cerebral de sFab-mAb31 en la fig. 6 utilizando 10 mg/ml de mAb31 (construcción de la fig. 1A) y 13,3 mg/kg de sFab-mAb31 (construcción de la fig. 1B). Ya 8 horas después de la inyección de la construcción de sFab-mAb31, hay una captación masiva en comparación con mAb31 (aproximadamente un aumento de 55 veces). Se obtuvieron datos similares después de 24 horas después de la dosis usando 25 mg/ml de mAb31 (construcción de la fig. 1A) y 33,3 mg/kg de sFab-mAb31 (construcción de la fig. 1B). La fig. 6 también muestra que la tinción capilar transitoria del sFab-mAb31 ilustra el efecto de orientación y el cruce de la BHE a lo largo del tiempo. Todos estos datos son altamente significativos como se indica en la fig. 6.

55 La fig. 7 muestra los datos de la construcción de mAb31 (construcción de la fig. 1A) y de sFab-mAb31 (construcción de la fig. 1B) a una dosis baja. De nuevo, solo la construcción de sFab-mAb31 puede atravesar las células endoteliales cerebrales y decorar la placa en el cerebro. El efecto máximo ya se alcanza 8 horas después de la dosis. Es solo a una dosis más alta (10 mg/kg) y en un tiempo relativamente largo (7 días) para la construcción de mAb31 que existe una tendencia al aumento de la señal de unión a las placas de Abeta en el cerebro (Fig. 7). Todos estos datos son altamente significativos como se indica en la fig. 7.

60 **Ejemplo 6: Regulación por disminución específica de TfR de superficie celular por una construcción de scFab doble**

65 Detalles experimentales: células bEnd3 cultivadas en un formato de placa de 6 pocillos. 2-3 días después de la confluencia, se trataron con dFab-mAb31, sFab-mAb31 o ctr sin tratar durante 24 horas. Se retiró/aspiró a continuación

el medio y se lavaron las células dos veces con PBS enfriado con hielo (-MgCl) (-CaCl) (Gibco 14190-094), 5 ml/pocillo. Se añadieron 1 ml de tripsina/EDTA (Lonza CC-5012)/pocillo y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos hasta que se separaron todas las células. Se detuvo la reacción con 1 ml de solución neutralizante de tripsina (enfriada con hielo) (Lonza CC-5002). Se recogieron 2 ml de tripsina/EDTA + solución de neutralización en un tubo Falcon de 50 ml y se mantuvieron en hielo. Centrifugación de las células a 4 °C con 1400 rpm durante 10 minutos. Se resuspendieron los sedimentos en 50 ml de medio bEnd3 enfriado con hielo (DMEM-12 (Gibco 31331) + de FBS al 10 %). Centrifugación de las células a 4 °C con 1400 rpm durante 10 minutos. Se resuspendió el sedimento en 3 ml de tampón FACS (BD 554656) enfriado con hielo. Recuentos celulares: a) viabilidad del tubo de sFab ($2,5 \times 10^5$ células/ml): 47 %, b) viabilidad del tubo de dFab ($3,18 \times 10^5$ células/ml): 55 %, c) viabilidad del tubo de ctr. ($4,6 \times 10^5$ células/ml): 57 %.

Tinción con FACS de 1×10^5 células/tubo Eppendorf distribuidas y centrifugadas (4 °C, 10 min, 1500 rpm). Sobrenadante aspirado; a) CD71-PE (clon R17217-IgG2a monoclonal) (Santa cruz sc-52504) 20 microl del anticuerpo/sedimento (volumen de tinción 100 microl) rellenado hasta 100 microl con tampón FACS (BD 554656) enfriado con hielo, b) CD31-APC (BD 551262) (anticuerpo de rata contra IgG2a derivado (200 microgramos/ml)) 5 microl de anticuerpo/sedimento (volumen de tinción 100 microl) rellenado hasta 100 microl con tampón FACS (BD 554656) enfriado con hielo, c) 8D3-Alexa488 (1:50) (volumen de tinción 100 microl) diluido en tampón FACS (BD 554656) enfriado con hielo, d) ctrl. isotópico para Alexa488, APC y PE (todos de BD). Incubación en la oscuridad en hielo durante 1 hora. Se llenó hasta 1,5 ml con tampón FACS enfriado con hielo y se centrifugó (4 °C, 10 min, 1500 rpm). Se lavó el sedimento dos veces con 1,5 ml de tampón FACS enfriado con hielo y finalmente se suspendió nuevamente el sedimento en 500 microl de PBS. Se realizó la medición de FACS usando el instrumento de citometría de flujo Guava. Los datos muestran que la construcción doble (dFab) (Fig. 8B) parece regular por disminución el receptor de transferrina sobre la superficie celular. Esto no es detectable en esta configuración de ensayo con la construcción única (sFab) (Fig. 8A), lo que indica que el modo de unión monovalente no tiene un efecto directo en la migración y el reciclado de células que determinan la cantidad de receptor de transferrina en la superficie celular en células endoteliales cerebrales.

Ejemplo 7: Clasificación intracelular *in vivo* de una construcción de scFab único y doble

Se inyectaron i.v. en ratones transgénicos APP^{swe}/PS2 (inyección en la cola) las siguientes construcciones de MAb31 (10 mg/kg), sFab-MAb31 (13,3 mg/kg) o dFab-MAb31 (17,44 mg/kg). La dosis inyectada refleja el tamaño de la molécula, con MAb31 usado como referencia. 15 minutos u 8 horas después de la inyección, los ratones se sacrificaron con CO₂ y se trataron como sigue. Se abrió la aurícula cardíaca derecha del corazón para que la sangre y la solución de perfusión pudieran salir. Se hizo una incisión en el ventrículo cardíaco izquierdo y se introdujo una sonda del n.º 10 en la aorta. Se inyectaron aproximadamente 20 ml de PBS (~10 ml/min, temperatura ambiente) seguido de 30 ml de PFA al 2 % en PBS. Se extrajeron los cerebros y se incubaron durante 7 h adicionales en el mismo perfundido. Se usó Vibratome para generar secciones cerebrales flotantes libres de 100 micrómetros que se usaron para la tinción de inmunofluorescencia. Se permeabilizaron primero las secciones y se bloquearon usando PBS-Triton X-100 al 0,3 %-10 % de suero de asno. Se incubaron entonces las secciones durante la noche con los anticuerpos primarios indicados diluidos en PBS-5 % de suero de asno. Se usaron los anticuerpos secundarios de las sondas moleculares siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se adquirieron imágenes usando un microscopio confocal Leica SP5, se usó el programa informático Imaris para el procesamiento de imágenes y la reconstrucción 3D.

Estos datos ilustran la captación de sFab-MAb31 y dFab-MAb31 administrados periféricamente por las células endoteliales cerebrales. Se detectaron MAb31, sFab-MAb31 y dFab-MAb31 usando un anticuerpo de cabra contra globulinas humana acoplado a Alexa 555. Como se muestra en la fig. 9, tanto sFab-MAb31 (Fig. 9A) como dFab-MAb31 (Fig. 9B) decoran la vasculatura cerebral 15 min después de la inyección sin diferencia en su distribución. 8 h después de la inyección, sFab-MAb31 alcanza el parénquima y decora las placas amiloides (flechas de la fig. 9C), mientras que dFab-MAb31 (Fig. 9D) permanece dentro de la vasculatura cerebral de manera similar al punto temporal de 15 min. No se detectaron placas de amiloide en el parénquima con el dFab-MAb31.

Fig. 10: Para controlar la integridad de todas las construcciones usadas en el estudio, se realizó la tinción de criosecciones cerebrales de 18 meses usando MAb31 (Fig. 10A), sFab-MAb31 (Fig. 10B) o dFab-MAb31 (Fig. 10C). Los resultados mostraron que las 3 construcciones detectaban placas de amiloide en el cerebro de ratones transgénicos.

Fig. 11-12: La microscopía confocal de alta resolución muestra que sFab (Fig. 11) y dFab-MAb31 (Fig. 12) no decoran el lado luminal de los capilares cerebrales, sino que están contenidos dentro de estructuras similares a vesículas que atraviesan la membrana luminal de las células endoteliales y dentro del citosol de células endoteliales. Las flechas en la fig. 11 y la fig. 12 indican vesículas que contienen construcciones de sFab o dFab-MAb31 en el lado abluminal de los núcleos de células endoteliales. En conjunto, estos datos sugieren que tanto sFab-MAb31 como dFab-MAb31 pueden entrar en las células endoteliales, pero solo sFab-MAb31 puede atravesar la vasculatura y alcanzar las placas de amiloide.

Los procedimientos y composiciones de la invención proporcionan una forma de mejorar drásticamente la parte de anticuerpo que se distribuye en el SNC y, por tanto, de alcanzar más fácilmente la concentración terapéutica en el SNC. Los procedimientos y composiciones de la presente invención son novedosos y mejoran significativamente la eficacia del cruce a través de los diferentes orgánulos dentro de las BEC usando una ruta/clasificación intracelular

óptima y sin problemas para alcanzar el lado abluminal.

Ejemplo 8: Modo de unión monovalente al receptor crucial para atravesar la BHE

5 El anticuerpo monoclonal anti-A β mAb31 es un producto de unión a placa A β muy específico y potente que proporciona una lectura potente para cuantificar la interacción con la diana dentro del parénquima cerebral. Se usa el modelo de amiloidosis transgénica doble PS2APP para investigar la cantidad de exposición cerebral de las dos construcciones de lanzadera cerebral en comparación con el anticuerpo original mAb31. Se inyectaron las tres variantes por ruta intravenosa a 10 mg/kg y se determinó el grado de exposición cerebral cuantificando la cantidad de anticuerpo presente en las placas 8 horas después de la inyección. Para la construcción de dFab no se detectó un aumento significativo en la decoración de la placa en comparación con mAb31 (Fig. 13A). Sin embargo, para la construcción de sFab hubo un aumento masivo en la decoración de la placa en comparación con el anticuerpo mAb31 original. La interacción con la diana en las placas amiloides mejoró más de 50 veces para la construcción de sFab en base a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia usando un anticuerpo secundario marcado. Mientras que la construcción de sFab mostraba una extensa decoración de la placa (Fig. 13D), el dFab solo era detectable en los microvasos (Fig. 13C), lo que indica que la construcción de dFab se orienta a los microvasos cerebrales, pero no logra escapar al lado abluminal. Se investigó la capacidad de interacción con la diana de la construcción de sFab a una dosis baja de 2,66 mg/kg y un tiempo de exposición *in vivo* prolongado de hasta 7 días. La decoración máxima de la placa se alcanzó en 8 horas, seguida de una unión persistente a placa durante al menos una semana después de una única inyección (Fig. 13E).

En un estudio anterior, se había demostrado que el mAb31 original alcanzaba la unión máxima a placa 7 días después de la inyección. La cuantificación de la tinción en estructuras de microvasos indicaba que la localización de la construcción de sFab era muy transitoria en la BHE, lo que ilustra la tasa relativamente rápida a la que la construcción atraviesa la barrera. Las imágenes representativas de tinción de placa para el anticuerpo original mAb31 a 2 mg/kg 7 días después de la inyección (Fig. 13F) y la concentración equimolar para la construcción de sFab (Fig. 13G) ilustran el aumento en la unión a placa que se logra con la construcción de lanzadera cerebral de sFab. La construcción de sFab muestra solo una colocalización menor con el compartimento lisosómico, que probablemente refleje la trans migración constitutiva normal del TfR al lisosoma. Los estudios *in vitro* también mostraban el reciclado y la transcitosis de la construcción de sFab.

Tomados conjuntamente, estos hallazgos sugieren que la construcción de sFab no interfiere con la trans migración normal de TfR. En cambio, la construcción de dFab muestra una fuerte colocalización con el compartimento lisosómico pero no tiene actividad de transcitosis, ni *in vitro* ni *in vivo*.

Ejemplo 9: El aumento del suministro de anticuerpos a través de la BHE se traduce en una potencia *in vivo* potenciada

En el siguiente conjunto de experimentos, se plantea si el aumento significativo en la exposición cerebral usando un modo de unión monovalente mejora la potencia *in vivo* del anticuerpo anti-A β en un estudio de tratamiento a largo plazo. Se inyectaron la construcción de sFab y el anticuerpo original de control mAb31 semanalmente durante tres meses. En un estudio previo de 5 meses, el anticuerpo terapéutico mAb31 había mostrado que reducía la carga de placa a 20 mg/kg. En base a los datos que se muestran en la figura 14, se seleccionaron dos dosis bajas para investigar si una exposición cerebral mejorada daría lugar a una potencia *in vivo* potenciada. La unión a placa diana al final indicaba que a ambas dosis había una mayor interacción con la diana con la construcción de sFab que con el anticuerpo mAb31 original (Fig. 14 AD). Se cuantificó el grado de amiloidosis en los ratones transgénicos dobles APPS2 en el valor de referencia, y después del tratamiento con vehiculo, mAb31 original a dosis baja y construcción de sFab a dosis baja. A estas dosis bajas, no se detectó ningún efecto *in vivo* con el mAb31 monoclonal original (Fig. 14E), lo que se preveía en base a un estudio previo a largo plazo durante 5 meses. En cambio, se observó una reducción significativa en el número de placas tanto en la corteza como en el hipocampo a la dosis baja de 2,67 mg/kg de la construcción de sFab. Incluso a una dosis mucho menor de 0,53 mg/kg (Fig. 14E), se observó una tendencia a favor de la construcción de sFab, especialmente en la corteza, aunque no alcanzó significación estadística. Un análisis secundario de los tamaños de placa revelaba una reducción más pronunciada de los números de placa para placas pequeñas, de acuerdo con el modo de acción para mAb31. Estos datos indican que una mayor penetración en el cerebro, permitida por un modo monovalente de unión a TfR, da lugar a una mejora significativa en la potencia de un anticuerpo terapéutico en un modelo animal crónico de patología de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 10: Función efectora de diferentes proteínas de fusión de anticuerpos en células TfR + BaF3 *in vitro* (ADCC)

Se usaron células BaF3 que expresan el receptor de transferrina (DSMZ, n.º CLPZ04004) (TfR+) como células diana para experimentos de toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) inducidos por diferentes moléculas de fusión de anticuerpo.

Brevemente, se sembraron 1×10^4 células BaF3 en 96 pocillos de fondo redondo y opcionalmente se cocultivaron con células efectoras NK92 humanas (clon de CD16 de alta afinidad 7A2F3; Roche GlycArt) a una proporción efector/diana

de 3:1 en presencia o ausencia de proteínas de fusión de anticuerpo. Después de cuatro horas de incubación (37 °C, 5 % de CO₂), se valoró la citotoxicidad medida por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células muertas/moribundas. Para esto, las células se centrifugaron durante 5 min a 250 × g y se transfirieron 50 µl de sobrenadante a una placa de fondo plano. Se añadieron 50 µl de mezcla de reacción de LDH (mezcla de reacción de LDH Roche, n.º de cat. 11644793001; Roche Diagnostics GmbH) y se incubó la reacción durante 20 min a 37 °C, 5 % de CO₂. Posteriormente, se midió la absorbancia en un lector Tecan Sunrise a una longitud de onda de 492/620 nm.

Todas las muestras se sometieron a prueba por triplicado y los resultados se calcularon en base a los siguientes controles:

- Solo células diana (+ medio)
- Liberación máxima de LDH: células diana + Triton-X al 3 %
- Liberación espontánea: células diana + células NK (E:T de 3:1)

El % de ADCC/lisis específica se calculó mediante el siguiente término:

$$\% \text{ de ADCC especif.} = \frac{\text{Muestra - liberación espontánea}}{\text{Liberación máxima - liberación espontánea}} \times 100$$

Fig. 15: La fusión de anticuerpos con fragmentos scfab de TfR fusionados con el extremo C de Fc no induce ADCC. Se midió la destrucción mediada por NK92 de células de eritroleucemia de ratón BA/F3 cuantificando la liberación de FDH. Solo las construcciones de fusión con el resto Fab de unión a TfR en la orientación "convencional" "N-terminal a Fc" inducen una ADCC significativa, mientras que las construcciones de lanzadera del cerebro en orientación inversa son inactivos. Construcciones: 8D3-IgG (8D3 IgG de longitud completa), OA-8D3 (cadena pesada única de 8D3 IgG), mAb31 (anticuerpo de la fig. 1A), mAb31-8D3-sFab (construcción de la fig. 1B), mAb31-8D3-dFab (construcción de la fig. 1C).

Ejemplo 11: Cartografía de epítomos del anticuerpo 8D3 de mTfR

Se llevó a cabo la cartografía de epítomos del anticuerpo monoclonal 8D3 por medio de una colección de fragmentos de péptidos inmovilizados superpuestos (longitud: 15 aminoácidos, desplazamiento: 3 aminoácidos) correspondiente a la secuencia del dominio extracelular del receptor 1 de transferrina de murino (90-763). Para la preparación de la matriz de péptidos se empleó la tecnología Intavis CelluSpots™. En este enfoque, los péptidos se sintetizan con un sintetizador automatizado (Intavis MultiPep RS) sobre discos de celulosa modificados que se disuelven después de la síntesis. Las soluciones de los péptidos individuales que permanecen unidos covalentemente a la celulosa macromolecular se imprime a continuación sobre portaobjetos de microscopio recubiertos. La síntesis por CelluSpots™ se llevó a cabo por etapas usando la química de 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) en discos de celulosa aminomodificados en una placa de síntesis de 384 pocillos. En cada ciclo de acoplamiento, se activaron los aminoácidos correspondientes con una solución de DIC/HOBt en DMF. Entre las etapas de acoplamiento, se funcionalizaron los grupos amino no reaccionados con una mezcla de anhídrido acético, diisopropiltilamina y 1-hidroxibenzotriazol. Tras la terminación de la síntesis, se transfirieron los discos de celulosa a una placa de 96 pocillos y se trataron con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), diclorometano, triisopropilsilano (TIS) y agua para desprotección de la cadena lateral. Después de la extracción de la solución de escisión, se disuelven los péptidos unidos a celulosa con una mezcla de TFA, TFMSA, TIS y agua, se precipitan con éter diisopropílico y se resuspenden en DMSO. Se imprimieron posteriormente las soluciones peptídicas sobre placas Intavis CelluSpots™ usando un robot de impresión en portaobjetos Intavis.

Para el análisis de epítomos, se lavaron con etanol los portaobjetos preparados y después con solución salina tamponada con Tris (TBS, Tris 50 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 8) antes de llevar a cabo una etapa de bloqueo durante 16 h a 4 °C con 5 ml de 10x reactivo de bloqueo Western (Roche Applied Science), 2,5 g de sacarosa en TBS, Tween 20 al 0,1 %. Después del lavado (TBS + Tween 20 al 0,1 %), se incubaron los portaobjetos con una solución (1 µg/ml) de anticuerpo 8D3 en TBS + Tween 20 al 0,1 % a temperatura ambiente durante 2 h. Después del lavado, se incubaron los portaobjetos para detección con un anticuerpo HRP secundario contra globulinas de ratón (1:20000 en TBS-T) seguido de incubación con sustrato de quimioluminiscencia luminol y se visualizaron con Lumilimager (Roche Applied Science). Se cuantificaron SPOT positivos para ELISA y, mediante la asignación de las secuencias peptídicas correspondientes, se identificaron los epítomos de unión a anticuerpo.

Fig. 16: 8D3 se une a tres péptidos distintos en el dominio extracelular del receptor de transferrina de ratón. Se reveló la unión del anticuerpo 8D3 a péptidos de 15 meros que se superponen con tres aminoácidos mediante la detección quimioluminiscente del anticuerpo incubado en un portaobjetos CelluSpot que porta péptidos de mTfR inmovilizados. Recuadro: Péptidos n.º 373, 374 y 376 unidos a 8D3.

ID	de	Secuencia peptídica	Número de secuencia
----	----	---------------------	---------------------

péptido		
373	I-G-Q-N-M-V-T-I-V-Q-S-N-G-N-L	SEQ ID. NO 14.
374	N-M-V-T-I-V-Q-S-N-G-N-L-D-P-V	SEQ ID. NO 15.
376	Q-S-N-G-N-L-D-P-V-E-S-P-E-G-Y	SEQ ID. NO 16.

Tabla 1: secuencias peptídicas del dominio extracelular de mTfR unidas por 8D3 en el experimento de cartografía peptídica.

5 En el presente documento se describe un grupo de construcciones bioterapéuticas contra un receptor de la barrera hematoencefálica, en particular el receptor de transferrina (TfR), que puede suministrar agentes terapéuticos que incluyen anticuerpos, proteínas, péptidos y moléculas pequeñas a través de la BHE a dosis terapéuticamente pertinentes. La distribución de determinadas construcciones bioterapéuticas genomanipuladas cambiaba del espacio cerebrovascular al espacio parenquimático unas pocas horas después de la inyección, lo que indica que estas

10 construcciones particulares utilizan una vía de transporte óptima a través de las BEC para permitir la transcitosis de una cantidad significativa de productos bioterapéuticos a través de las BEC para alcanzar el parénquima. El grado de captación y distribución de construcciones bioterapéuticas en el SNC era completamente dependiente del modo de unión monovalente al receptor de barrera hematoencefálica, en particular TfR. Cuando el TfR se dimerizó por la unión de la construcción bioterapéutica al R/BHE, no se detectó ningún nivel detectable dentro del espacio parenquimático.

15 Una única dosis sistémica de la construcción monoclonal de Fab único anti-Abeta genomanipulado usando la metodología de la invención no solo dio como resultado una captación significativa de anticuerpo en el cerebro, sino que también aumentó drásticamente la decoración de la unión del anticuerpo monoclonal anti-Abeta a las placas de amiloide patológicas. Sin embargo, al usar una construcción de unión a Fab doble contra el R/BHE, no se detectaron niveles detectables dentro del SNC. Los hechos y los experimentos representados en esta solicitud ilustran los

20 mecanismos contribuyentes clave detrás del incremento de la captación de un producto bioterapéutico (tal como anticuerpos) en el SNC usando un modo de unión monovalente contra un R/BHE. En primer lugar, un modo de enlace dual (o multimérico) anti-R/BHE limita la captación cerebral al regular por disminución el R/BHE sobre la superficie celular en el lado luminal, lo que reduce la cantidad total de anti-R/BHE que se puede captar en la vasculatura, que es la primera etapa para atravesar eficazmente la BHE. En segundo lugar, un modo de unión anti-R/BHE dual (o multimérico) induce una clara falta de clasificación intracelular en las BEC que impide que la construcción alcance el

25 lado abluminal. Sorprendentemente, la unión monovalente a R/BHE mejora la captación y la distribución cerebral, con un desplazamiento completo observado en la localización desde la vasculatura a las placas amiloides dentro del SNC. En segundo lugar, el modo de unión monovalente genomanipulado de las construcciones bioterapéuticas para el R/BHE asegura el reciclado del R/BHE hacia el lado luminal para permitir la captación de construcción de polipéptido de fusión adicional y el transporte al lado abluminal y al parénquima. En tercer lugar, la construcción bioterapéutica de modo de unión monovalente está genomanipulada en el extremo C-terminal de la parte Fc de una IgG que conserva el formato original para un anticuerpo monoclonal terapéutico, lo que en la mayoría de los casos es crítico para la

30 eficacia *in vivo*. Esto también se puede lograr uniendo a otra parte de una IgG descrita en de esta solicitud. Esto es ventajoso porque se pueden incorporar a este sistema de transporte anticuerpos monoclonales IgG ya desarrollados con eficacia clínica y preclínica establecidas sin comprometer la función y la eficacia establecidas. Además, la tecnología de diana monovalente a R/BHE basada en el transporte mediado por receptor (RMT) abre la puerta a una amplia gama de agentes terapéuticos potenciales para las enfermedades del SNC. La invención proporciona procedimientos de genomanipulación de agentes terapéuticos que penetran en la BHE, que conservan los formatos de IgG existentes con actividades terapéuticas probadas, que mejoran en gran medida el transporte a través de la

35 BHE y la distribución en el SNC del agente terapéutico.

40

Secuencias de aminoácidos divulgadas

Nombre de secuencia de aminoácidos	Número de identificación de secuencia (SEQ ID. NO)
Cadena pesada de Mab31-scFab (8D3)	1
Cadena ligera de Mab31	2
Cadena pesada de botón de Mab31-scFab (8D3)	3
Cadena pesada de ojal de Mab31-scFab (8D3)	4
V _H CDR1 de Mab 31	5
V _H CDR2 de Mab 31	6
V _H CDR3 de Mab 31	7
V _L CDR1 de Mab 31	8
V _L CDR2 de Mab 31	9
V _L CDR3 de Mab 31	10
V _H de Mab 31	11
V _L de Mab 31	12

ES 2 733 324 T3

Conector peptídico (G ₄ S) ₆ G ₂	13
Péptido de cartografía de epítomos 373 de 8D33	14
Péptido de cartografía de epítomos 374 de 8D33	15
Péptido de cartografía de epítomos 376 de 8D33	16
Conector peptídico (G ₄ S) ₄	17

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> Lanzaderas de barrera hematoencefálica
- <130> 30805 WO
- <150> 12182181,3
- 10 <151> 29/08/2012
- <160> 17
- <170> PatentIn version 3.5
- 15 <210> 1
- <211> 959
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Polipéptido de fusión
- <400> 1

```

25 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
    1           5           10           15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
    20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
    35           40           45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50           55           60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
    65           70           75           80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
    85           90           95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
    100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
    115          120          125
    
```

ES 2 733 324 T3

Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350

ES 2 733 324 T3

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 485 490 495

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu Glu Ile Val Thr
 500 505 510

Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp Leu Ala Trp Tyr
 515 520 525

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr
 530 535 540

Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly
 545 550 555 560

Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Ile Gly
 565 570 575

ES 2 733 324 T3

Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly
580 585 590

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
595 600 605

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
610 615 620

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
625 630 635 640

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
645 650 655

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
660 665 670

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
675 680 685

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
690 695 700

Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
705 710 715 720

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
725 730 735

Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
740 745 750

Gly Asn Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
755 760 765

Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu
770 775 780

Trp Ile Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr Ala Asp
785 790 795 800

ES 2 733 324 T3

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 805 810 815

Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 820 825 830

Tyr Cys Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln
 835 840 845

Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 850 855 860

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 865 870 875 880

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 885 890 895

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 900 905 910

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 915 920 925

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 930 935 940

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 945 950 955

- <210> 2
- 5 <211> 234
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción de cadena ligera
- <400> 2

ES 2 733 324 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr
100 105 110

Asn Met Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 3

ES 2 733 324 T3

<211> 959
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido de fusión

<400> 3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
 115 120 125

10 Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190

ES 2 733 324 T3

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430

ES 2 733 324 T3

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 485 490 495

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu Glu Ile Val Thr
 500 505 510

Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp Leu Ala Trp Tyr
 515 520 525

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr
 530 535 540

Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly
 545 550 555 560

Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Ile Gly
 565 570 575

Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 580 585 590

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 595 600 605

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 610 615 620

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 625 630 635 640

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 645 650 655

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 660 665 670

ES 2 733 324 T3

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 675 680 685

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 690 695 700

Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 705 710 715 720

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 725 730 735

Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 740 745 750

Gly Asn Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 755 760 765

Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu
 770 775 780

Trp Ile Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr Ala Asp
 785 790 795 800

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 805 810 815

Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 820 825 830

Tyr Cys Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln
 835 840 845

Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 850 855 860

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 865 870 875 880

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 885 890 895

ES 2 733 324 T3

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 900 905 910

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 915 920 925

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 930 935 940

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 945 950 955

<210> 4
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido de fusión

<400> 4

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
 115 120 125

Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140

ES 2 733 324 T3

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365

ES 2 733 324 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

5 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5 10

15 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

20 Gly

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 733 324 T3

Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Val

5 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

10 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

20 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

30 Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro Ile
 1 5

35 <210> 11
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

40 Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

ES 2 733 324 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 12
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector peptídico

<400> 13

ES 2 733 324 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

- 5 <210> 14
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Péptido de cartografía de epitopos
- <400> 14

Ile Gly Gln Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser Asn Gly Asn Leu
 1 5 10 15

- 15 <210> 15
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Péptido de cartografía de epitopos
- <400> 15

Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val
 1 5 10 15

- 25 <210> 16
- <211> 15
- <212> PRT
- 30 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de cartografía de epitopos
- 35 <400> 16

Gln Ser Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr
 1 5 10 15

- 40 <210> 17
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> Conector peptídico
- <400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

50

REIVINDICACIONES

1. Una lanzadera de barrera hematoencefálica que comprende una entidad efectora cerebral, un conector y una entidad de unión monovalente que se une a un receptor de transferrina, en la que el conector acopla la entidad efectora a la entidad de unión monovalente que se une a la receptor de transferrina, en la que la entidad de unión monovalente que se une al receptor de transferrina comprende un scFab dirigido al receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO 14, 15 o 16 y en la que la entidad efectora cerebral se selecciona del grupo que consiste en fármacos para trastornos neurológicos, factores neurotróficos y anticuerpos dirigidos a una diana cerebral seleccionada del grupo que consiste en β -secretasa 1, A β , factor de crecimiento epidérmico, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, Tau, Tau fosforilado, apolipoproteína E4, alfa-sinucleína, fragmentos oligoméricos de alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica, cinasa de repetición rica en leucina 2, parkina, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor de muerte 6, proteína precursora del amiloide, receptor de neurotrofina p75 y caspasa 6.
2. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 1, en la que la entidad efectora cerebral se selecciona del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos y péptidos.
3. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 2, en la que la entidad de unión monovalente que se une al receptor de transferrina que comprende un scFab dirigido al receptor de la transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 14, 15 o 16 está acoplada al extremo C-terminal de la entidad efectora cerebral mediante el conector.
4. La lanzadera de barrera hematoencefálica de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la entidad efectora cerebral comprende un anticuerpo de longitud completa dirigido a la diana cerebral.
5. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 4, en la que el anticuerpo de longitud completa es una IgG de longitud completa.
6. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 5, que comprende el anticuerpo IgG de longitud completa como entidad efectora cerebral, el conector y un scFab dirigido al receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 14, 15 o 16, en el que el scFab se acopla por el conector al extremo C-terminal de la parte Fc de una de las cadenas pesadas del anticuerpo IgG.
7. La lanzadera de barrera hematoencefálica de las reivindicaciones 4-6, en la que la entidad efectora es un anticuerpo de longitud completa dirigido a A β .
8. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 7, en la que el anticuerpo dirigido a A β comprende (a) H-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 5; (b) H-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 6; (c) H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 7; (d) L-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 8; (e) L-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 9 y (f) L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 10.
9. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 8, en la que el anticuerpo dirigido a Abeta comprende un dominio V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 11 y un dominio V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 12.
10. La lanzadera de barrera hematoencefálica de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la entidad efectora es un anticuerpo de longitud completa dirigido a Tau fosforilado.
11. La lanzadera de barrera hematoencefálica de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la entidad efectora es un anticuerpo de longitud completa dirigido a alfa-sinucleína.
12. La lanzadera de barrera hematoencefálica de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el conector es un conector peptídico.
13. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 12, en la que el conector peptídico es una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 20 aminoácidos.
14. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 13, en la que el conector peptídico es una secuencia de aminoácidos con una longitud de 25 a 50 aminoácidos.
15. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 1, en la que la entidad de unión monovalente

que se une al receptor de transferrina comprende una entidad CH2-CH3 de Ig y un scFab dirigido al receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 14, 15 o 16, en la que el scFab se acopla a un extremo C-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig por un segundo conector.

- 5
16. La lanzadera de barrera hematoencefálica de la reivindicación 15, que comprende la entidad efectora cerebral, el conector, el dominio CH2-CH3 de Ig, el segundo conector y un scFab dirigido al receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 14, 15 o 16, en la que la entidad efectora cerebral se acopla por el primer conector a un extremo N-terminal del dominio CH2-CH3 de Ig y el scFab se acopla a un extremo C-terminal del dominio CH2-CH3 de Ig por el segundo conector.
- 10
17. La lanzadera de barrera hematoencefálica de las reivindicaciones 15 o 16, en la que la entidad CH2-CH3 de Ig es una entidad CH2-CH3 de IgG.
- 15
18. Una proteína de fusión para transportar una entidad efectora cerebral a través de la barrera hematoencefálica que comprende una entidad CH2-CH3 de Ig, un conector y un scFab dirigido al receptor de transferrina que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO 14, 15 o 16, en la que el scFab se acopla a un extremo C-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig por el conector y en la que la entidad efectora cerebral se selecciona del grupo que consiste en fármacos para trastornos neurológicos, factores neurotróficos y fragmentos de anticuerpo dirigidos a una diana cerebral seleccionada del grupo que consiste en scFv, Fv, scFab, Fab, VHH, F(ab')₂ o péptidos dirigidos a una diana cerebral y en el que la diana cerebral se selecciona del grupo que consiste en β -secretasa 1, A β , factor de crecimiento epidérmico, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, Tau, Tau fosforilado, apolipoproteína E4, alfa-sinucleína, fragmentos oligoméricos de alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica, cinasa de repetición rica en leucina 2, parkina, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor de muerte 6, proteína precursora del amiloide, receptor de neurotrofina p75 y caspasa 6.
- 20
- 25
19. La proteína de fusión para transportar la entidad efectora cerebral a través de la barrera hematoencefálica de la reivindicación 18, en la que el conector es un conector peptídico.
- 30
20. La proteína de fusión de las reivindicaciones 18 o 19, en la que la entidad CH2-CH3 de Ig es una entidad CH2-CH3 de IgG.
- 35
21. Un conjugado que comprende una proteína de fusión para transportar una entidad efectora cerebral a través de la barrera hematoencefálica de las reivindicaciones 18 o 19 y la entidad efectora cerebral acoplada a un extremo N-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig de la proteína de fusión mediante un conector.
- 40
22. El conjugado de la reivindicación 21, en el que la entidad efectora cerebral se selecciona del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos y péptidos.
23. El conjugado de la reivindicación 22, en el que un extremo C-terminal de la entidad efectora está acoplado al extremo N-terminal de la entidad CH2-CH3 de Ig por el conector.

Fig. 1C

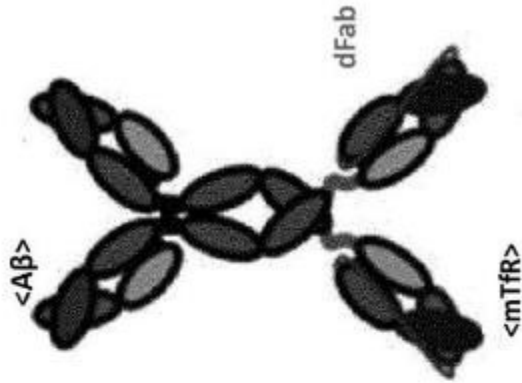


Fig. 1B

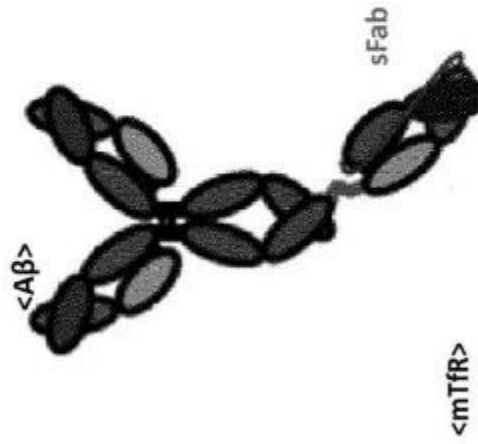
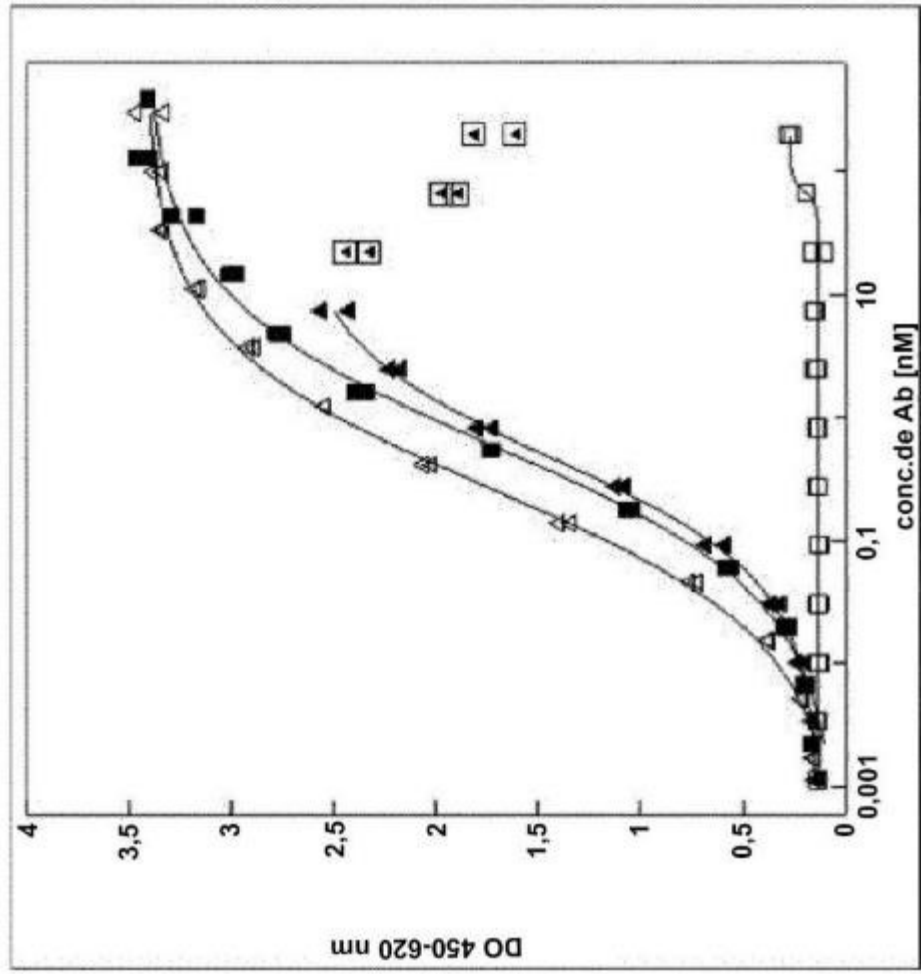


Fig. 1A



Fig. 2



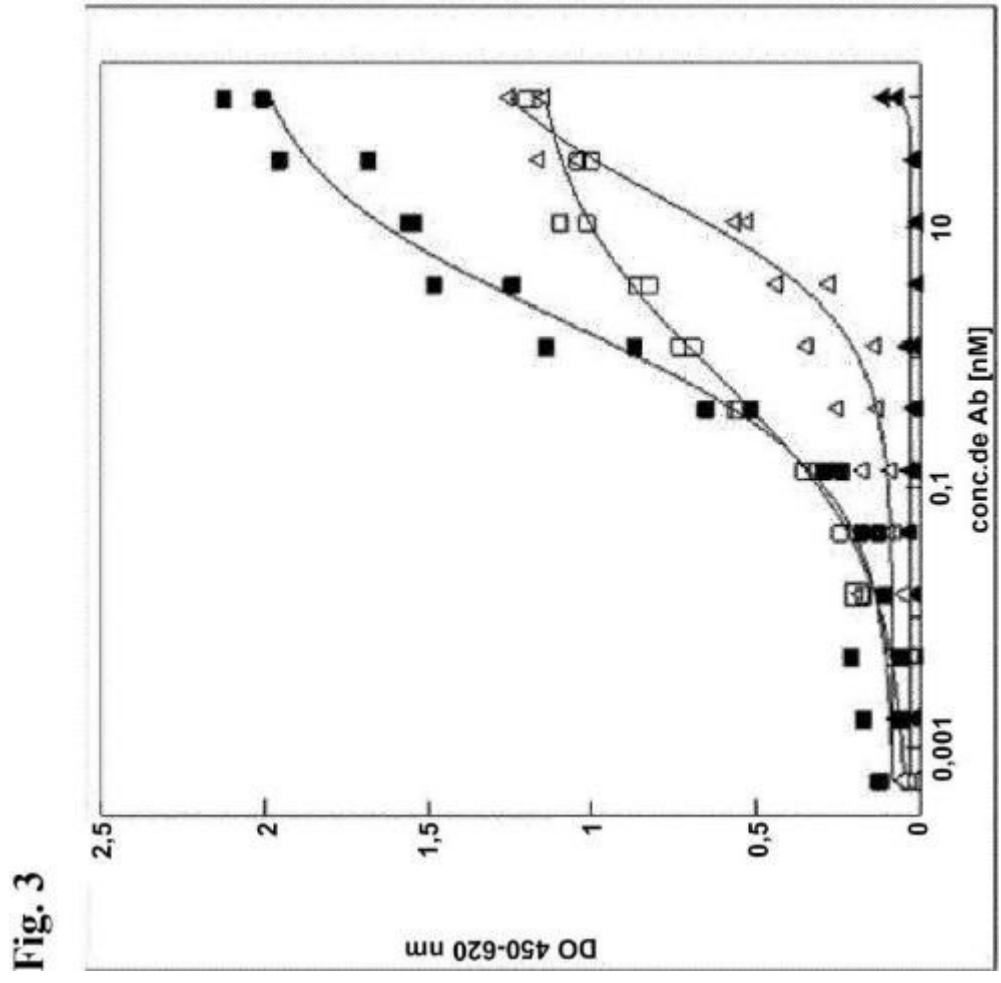
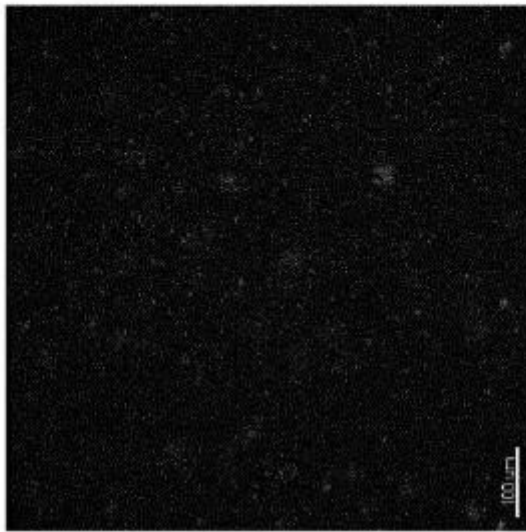
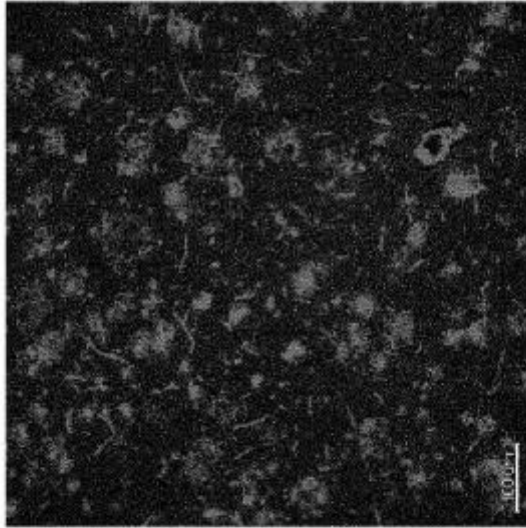


Fig. 4A



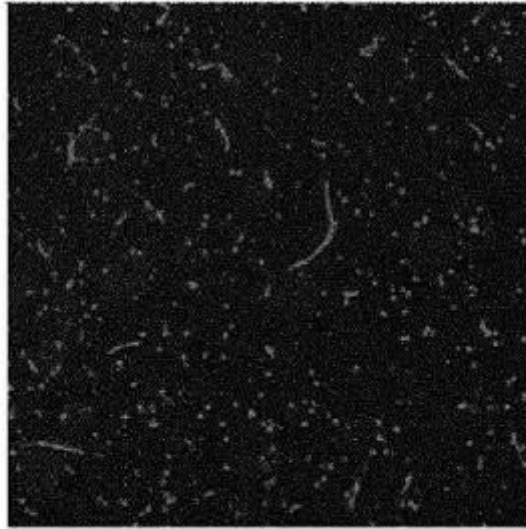
mAb31

Fig. 4B



sFab-MAb31

Fig. 4C

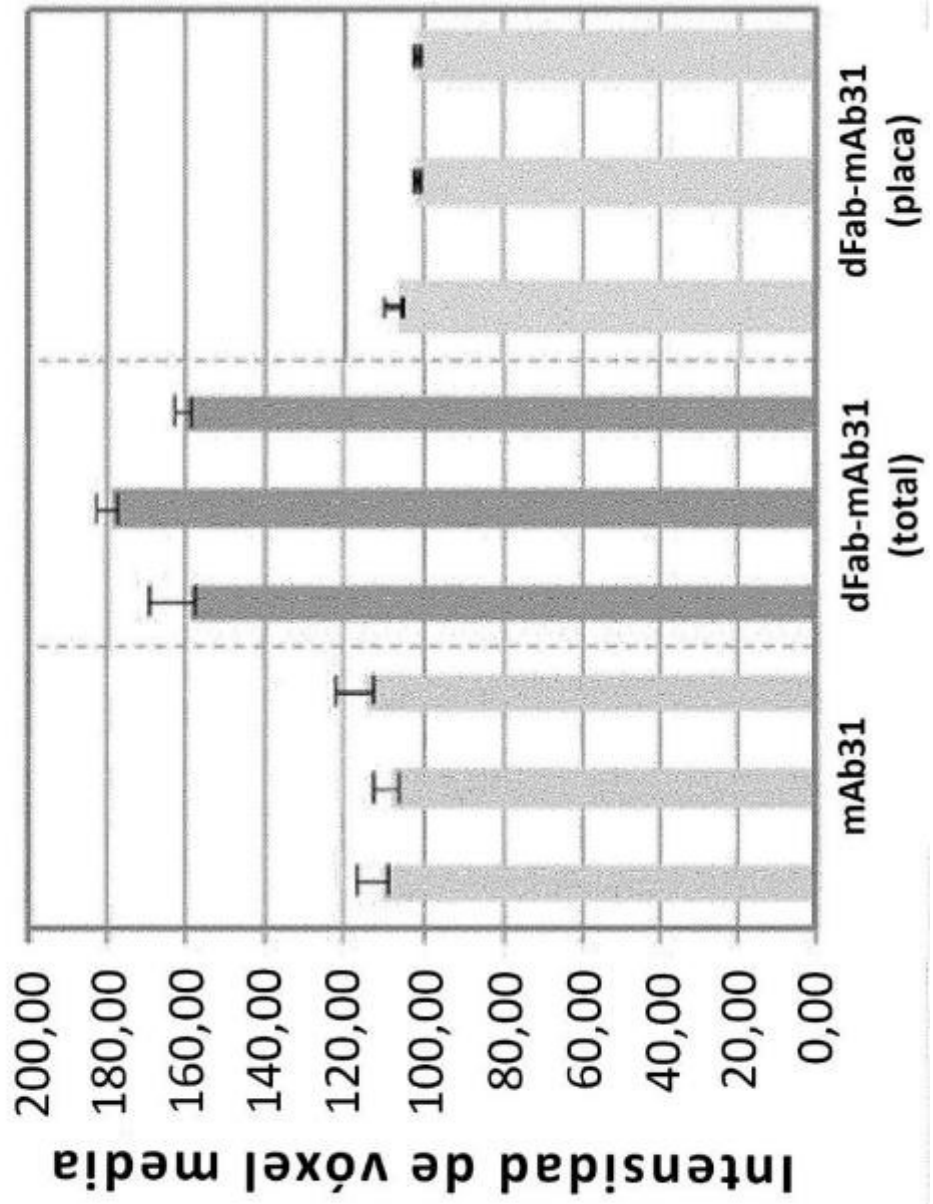


dFab-MAb31

Fig. 5

Cuantificación:

Intensidad de fluorescencia a 555 nm. 8 h después de dosis



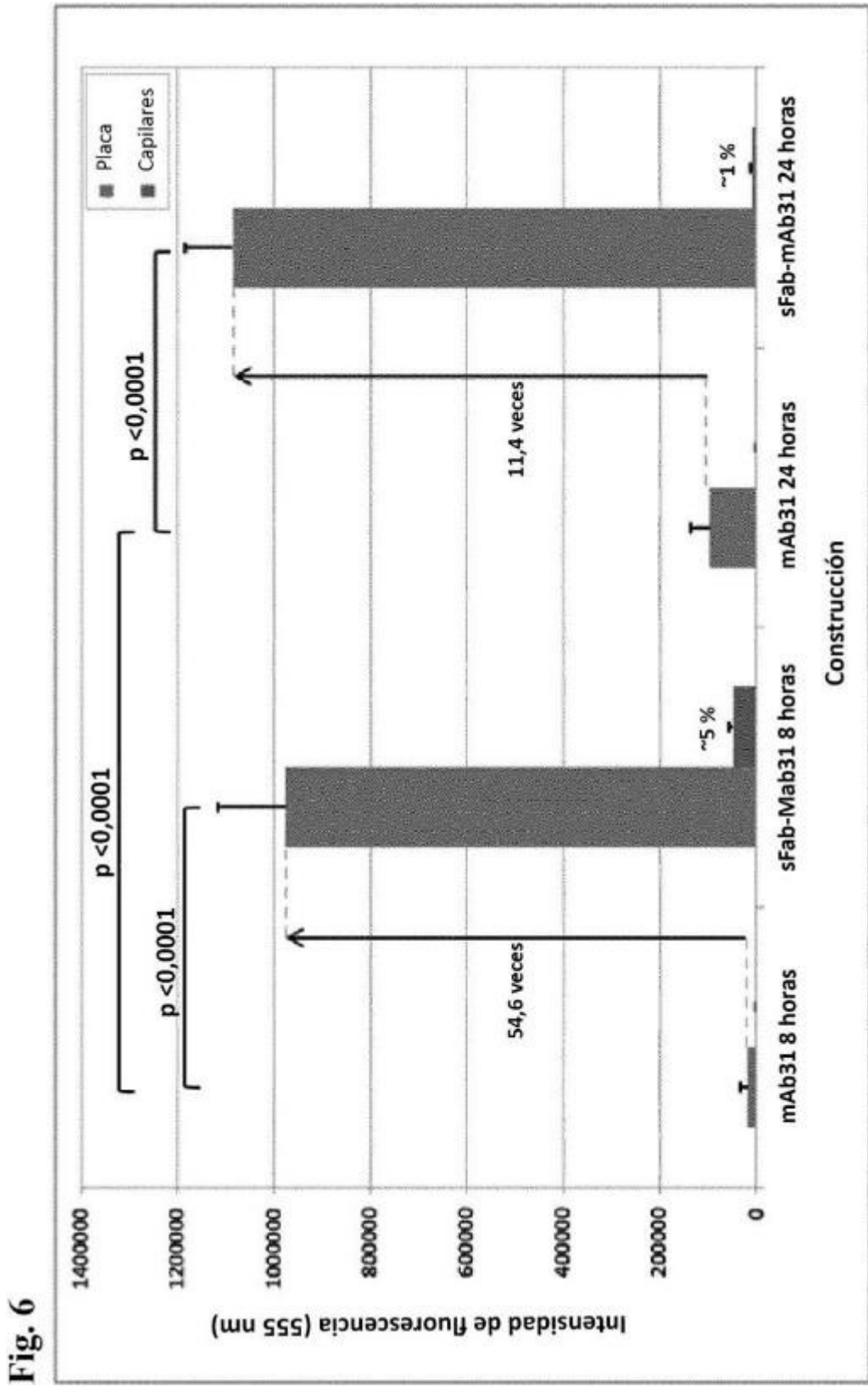


Fig. 7

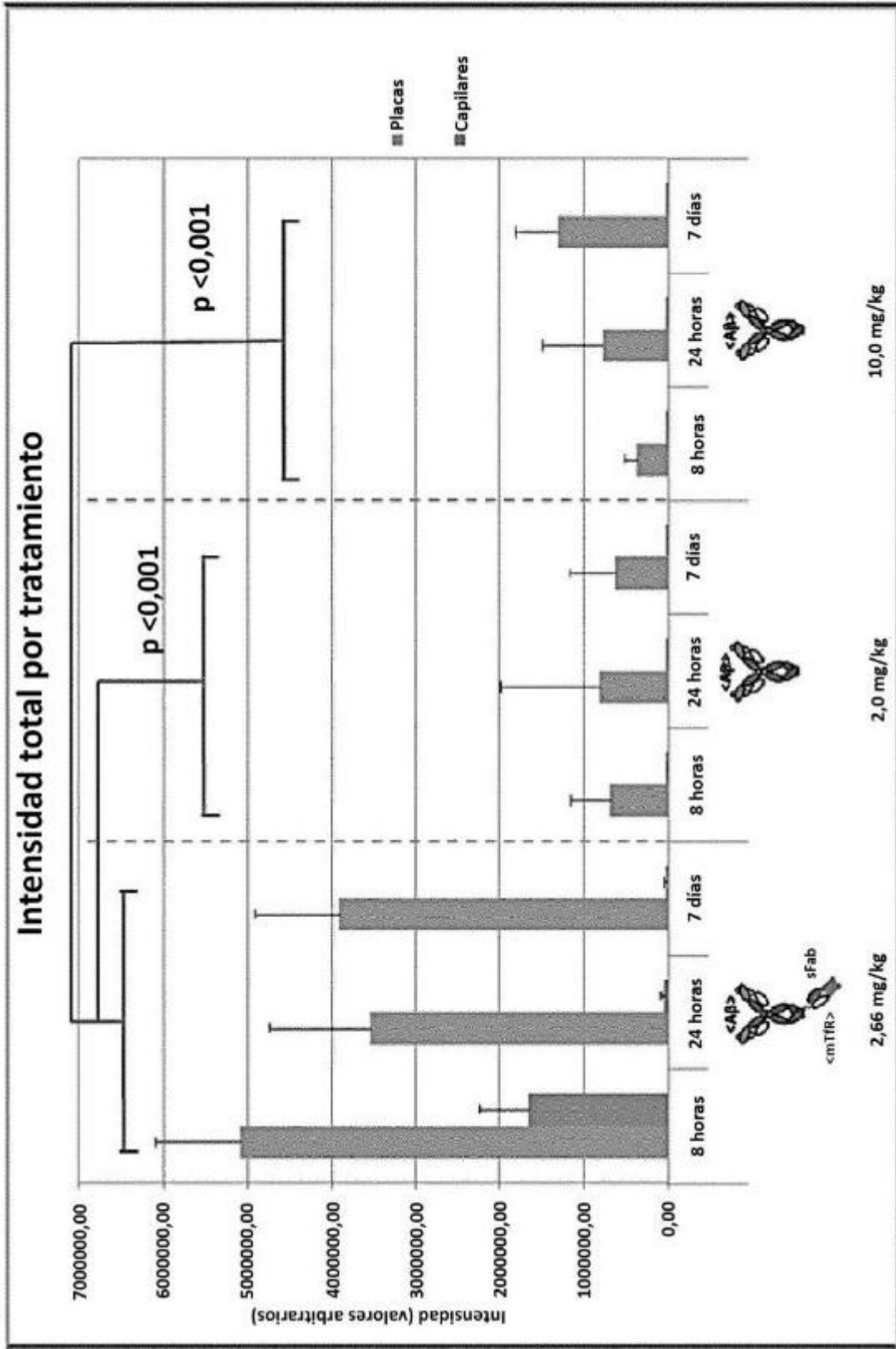
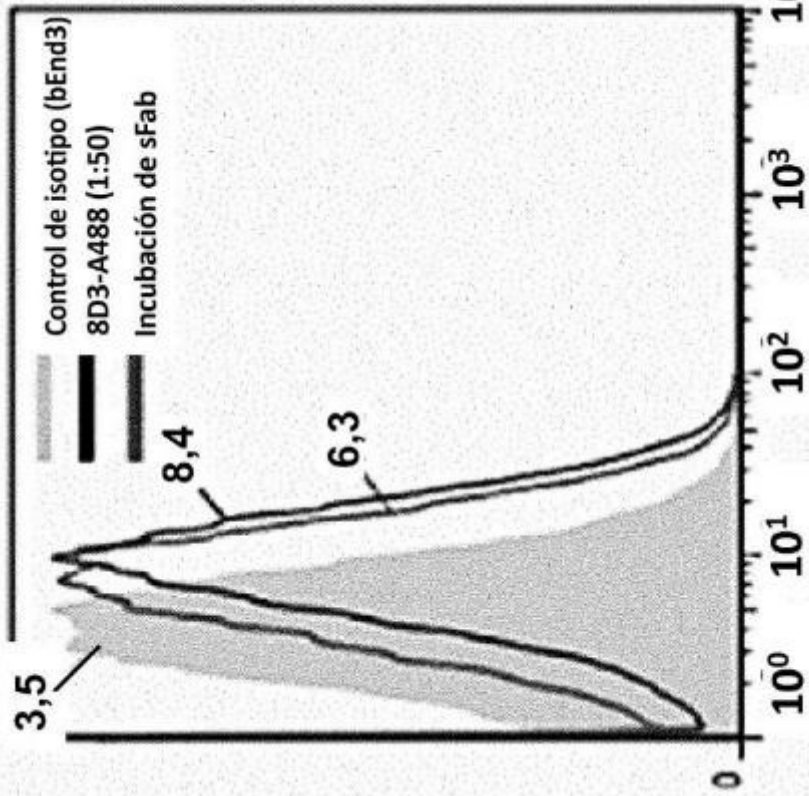


Fig. 8A



8D3-A488

Fig. 8B

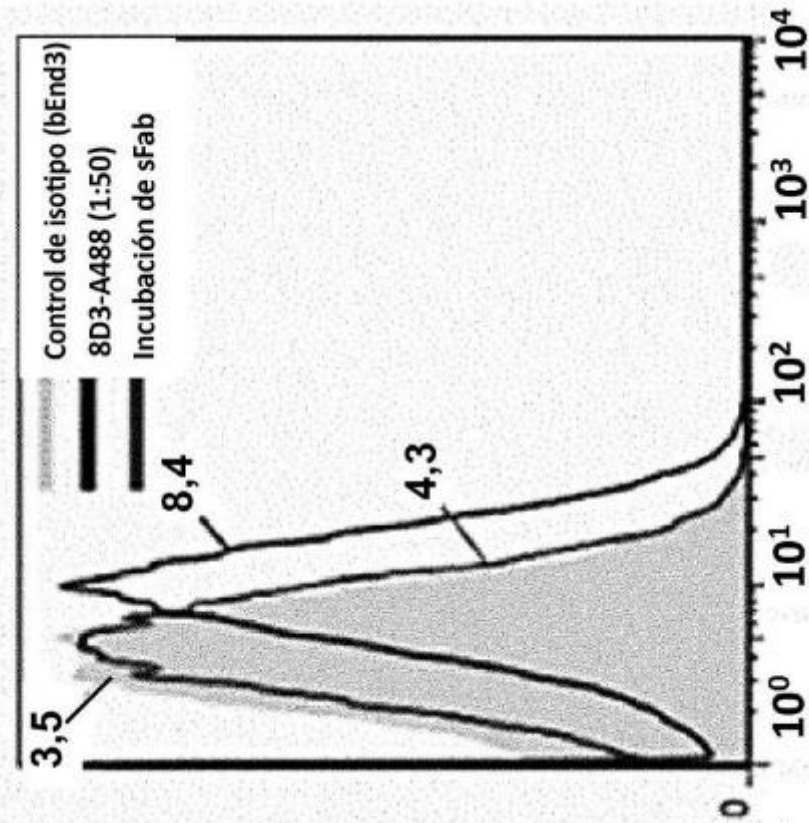


Fig. 9B

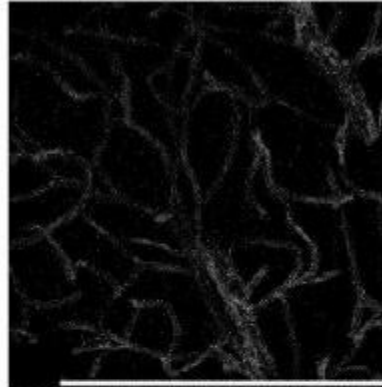


Fig. 9D

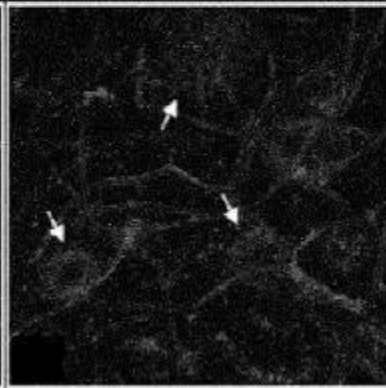
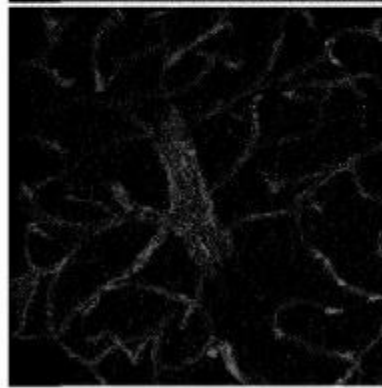
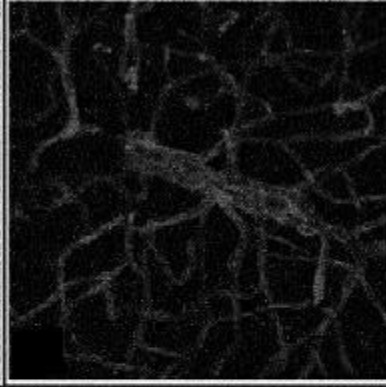


Fig. 9A

Fig. 9C

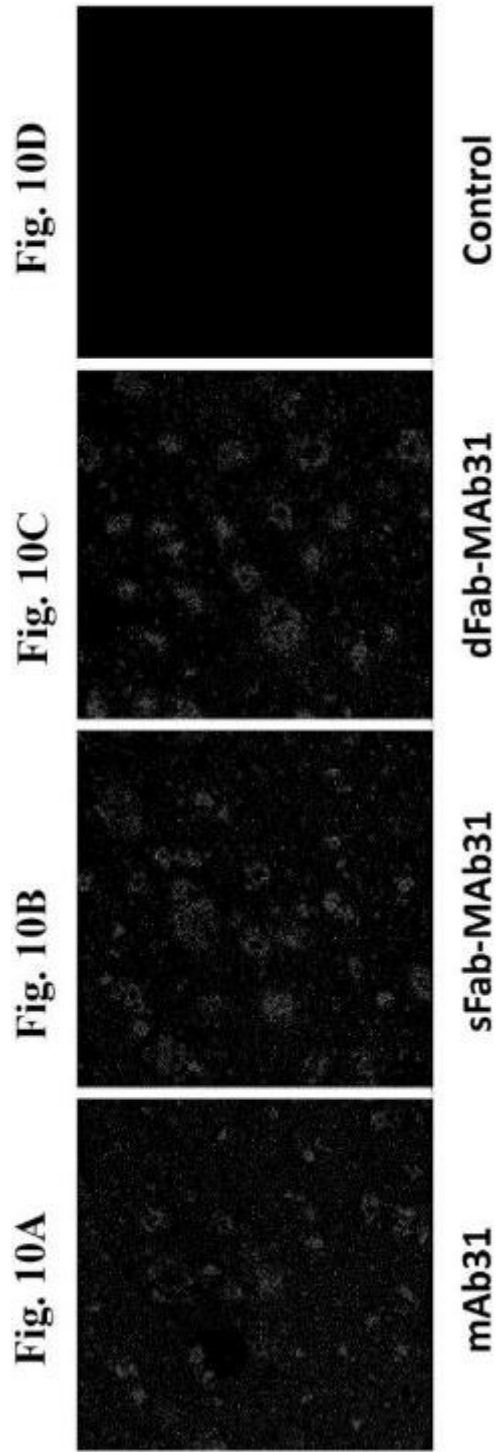


Fig. 11

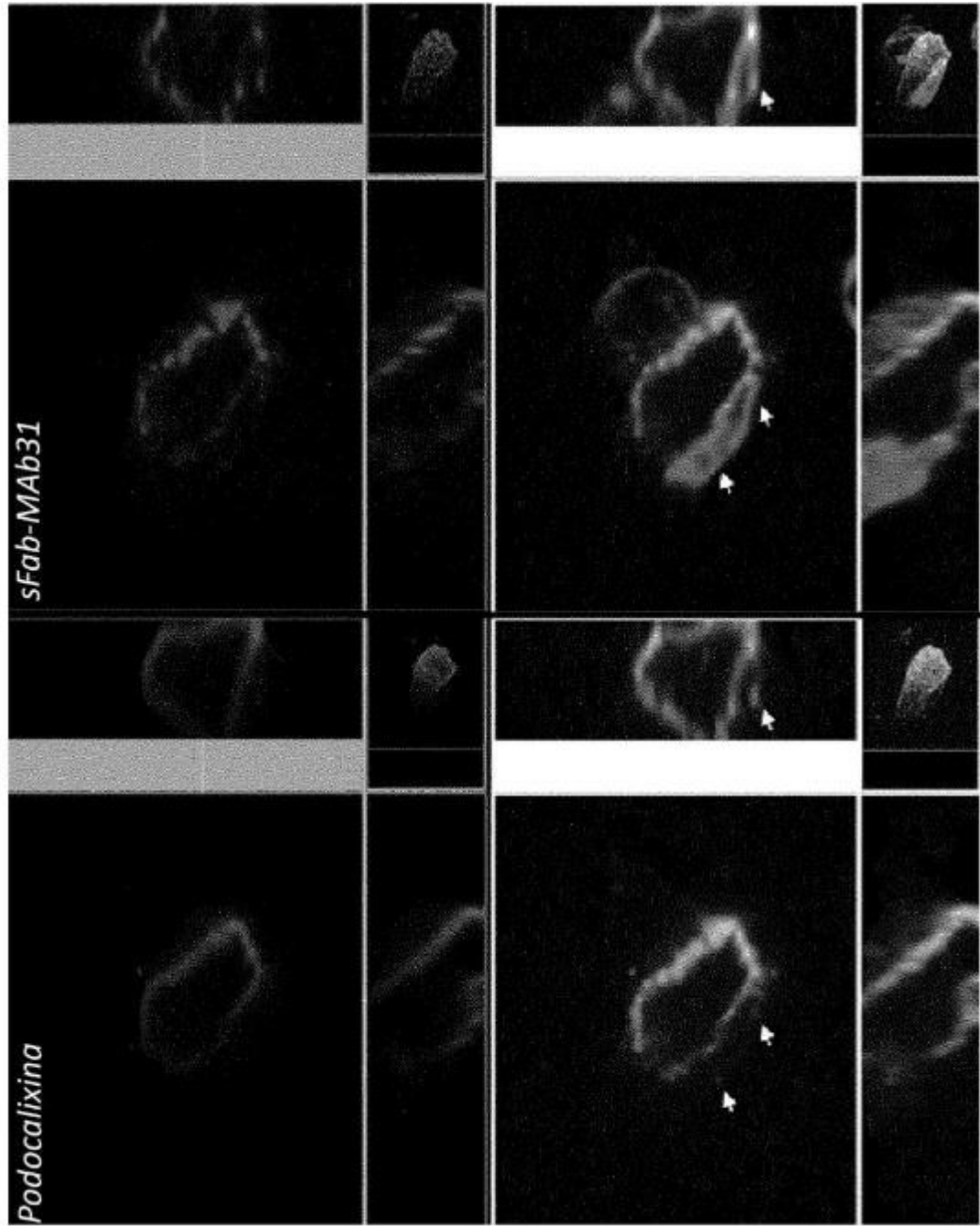


Fig. 12

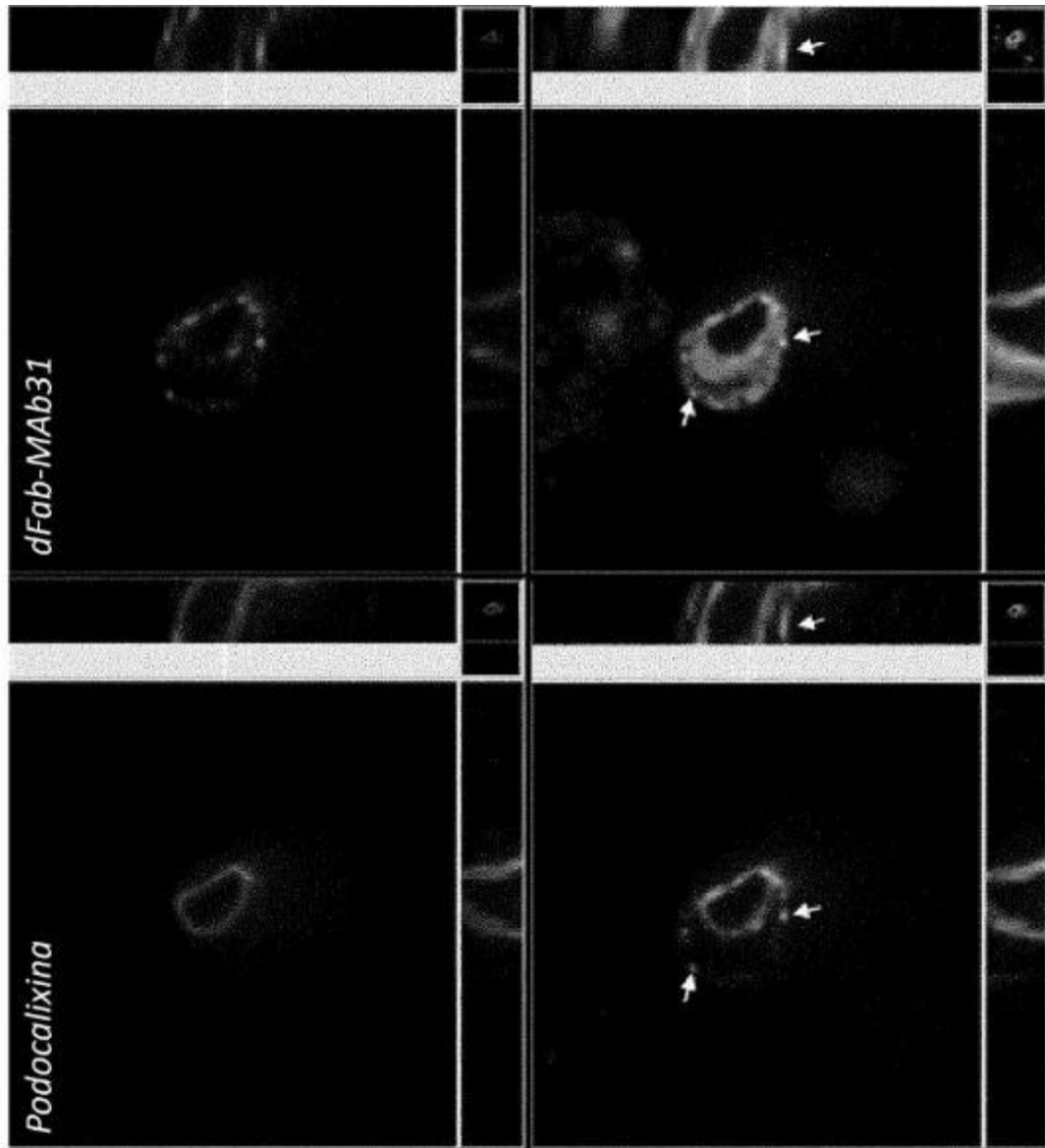


Fig. 13A

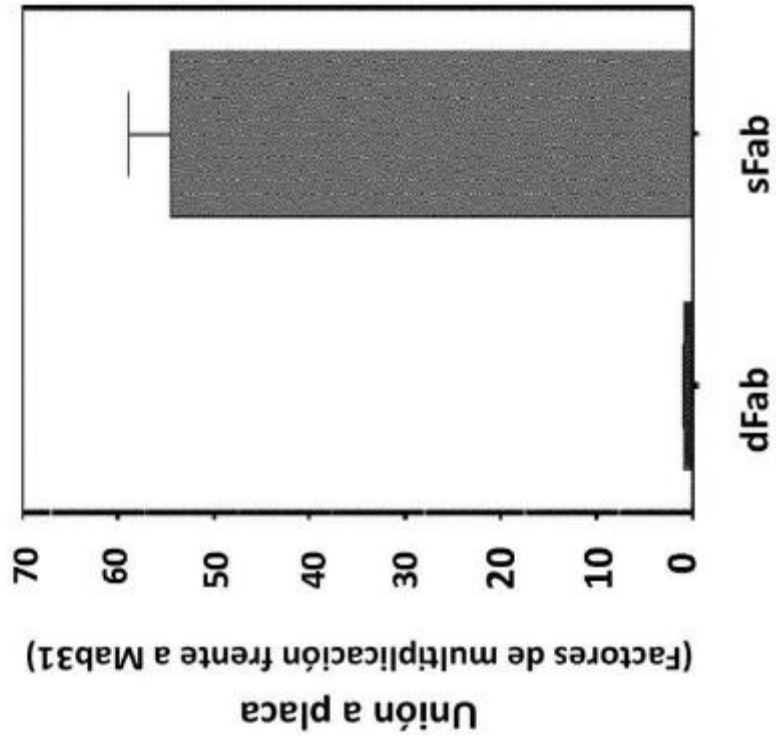


Fig. 13B

mAb31



Fig. 13C

dFab



Fig. 13D

sFab



Fig. 13E

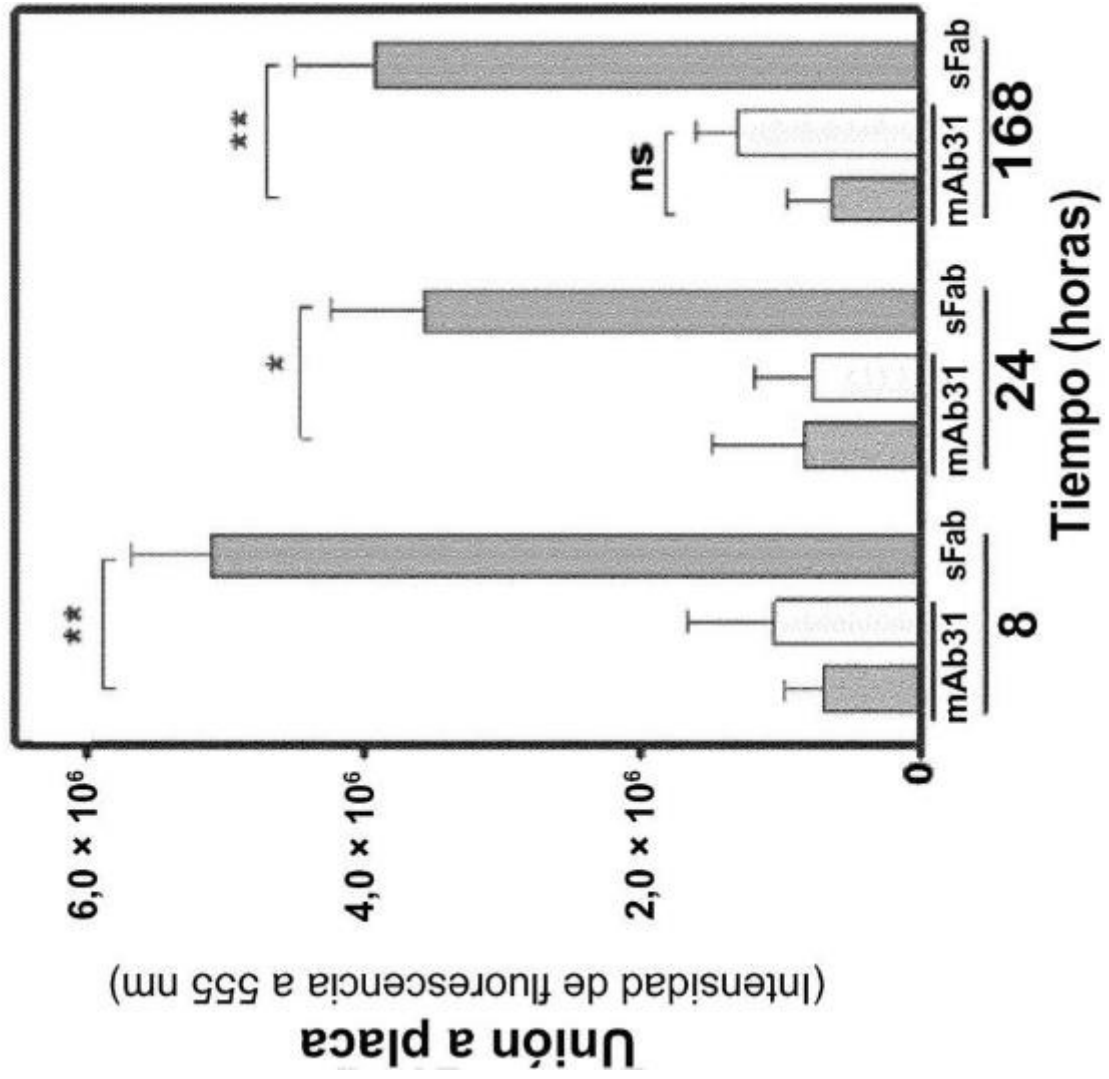


Fig. 13F
mAb31



Fig. 13G
sFab

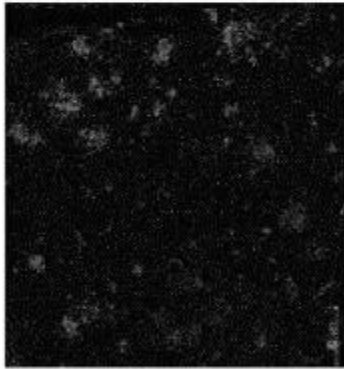


Fig. 14A
mAb31 a dosis baja



Fig. 14B
mAb31 a dosis media



Fig. 14C
sFab a dosis baja

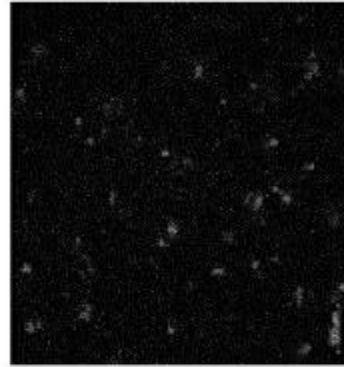


Fig. 14D
sFab a dosis media

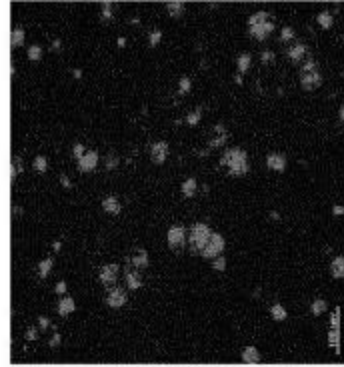


Fig. 14E

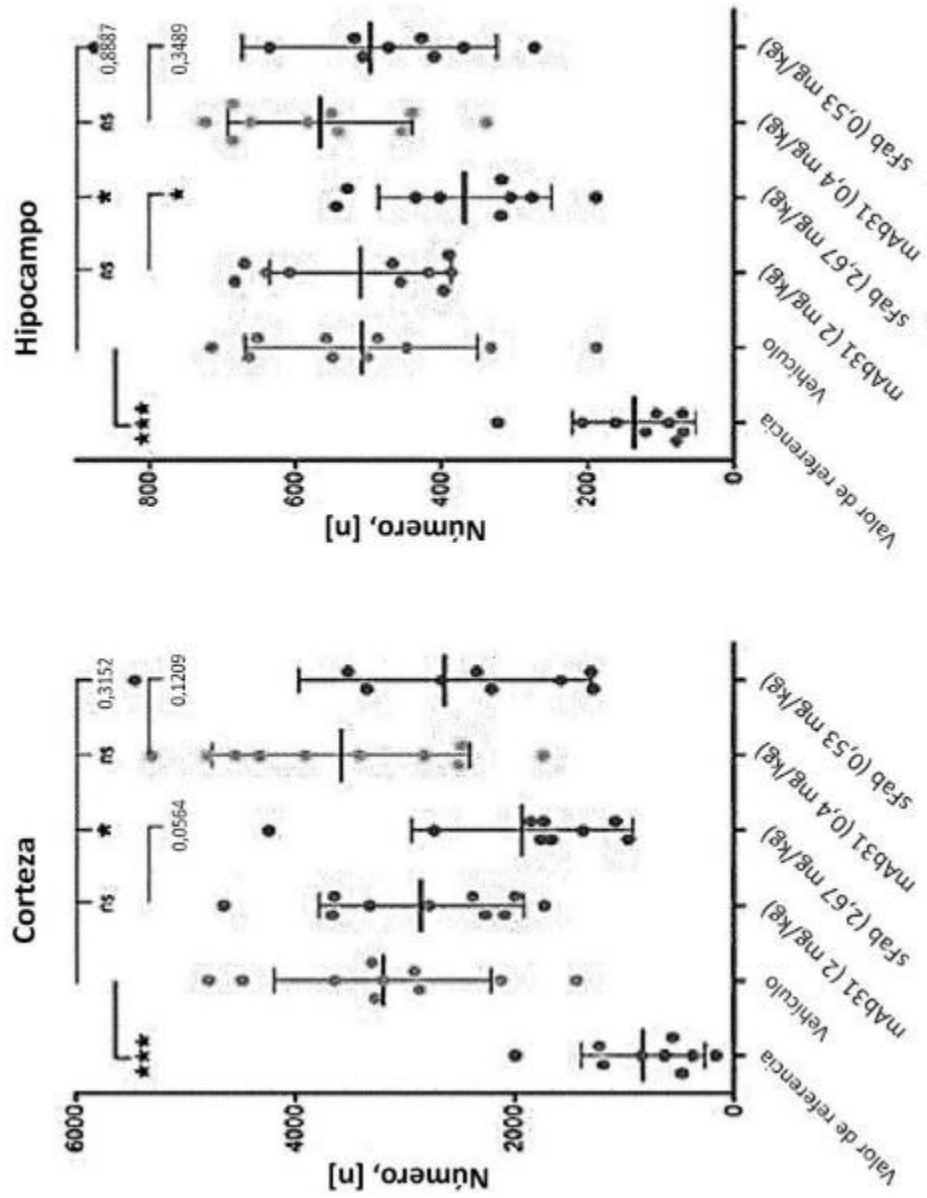


Fig. 15

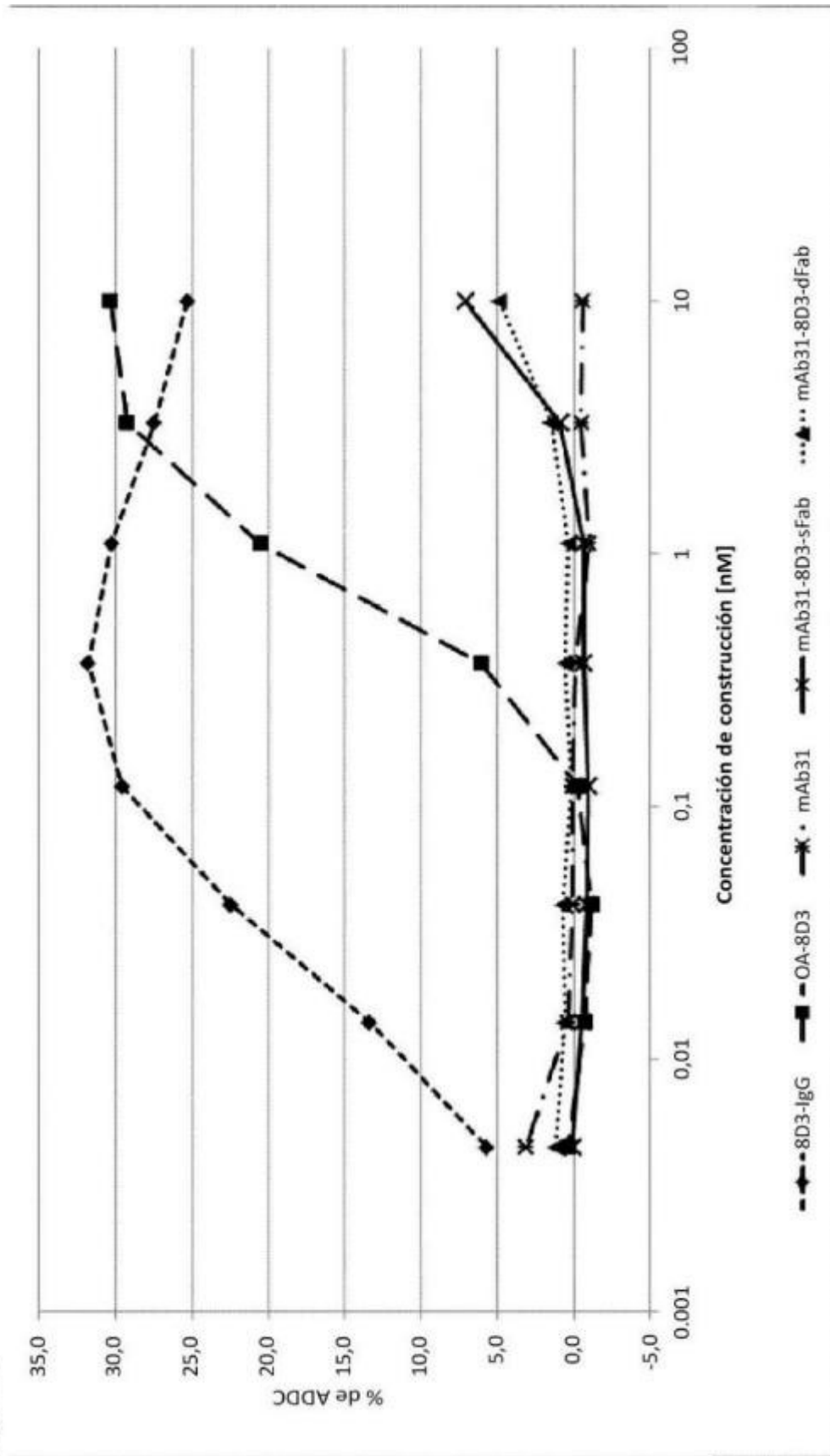


Fig. 16

Péptidos n.º 373, 374 y 376

