

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 063**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2014** **E 19190228 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023** **EP 3594240**

54 Título: **Anticuerpos antirreceptor de transferrina y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

20.05.2013 US 201361825477 P

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

24.05.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ZHANG, YIN;
ZUCHERO, JOY YU;
ATWAL, JASVINDER;
COUCH, JESSICA;
DENNIS, MARK;
ERNST, JAMES;
WATTS, RYAN y
LAZAR, GREGORY A.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 970 063 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

Anticuerpos antirreceptor de transferrina y procedimientos de uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos antirreceptor de transferrina y a procedimientos de uso de los mismos.

10 **Antecedentes**

La penetración en el cerebro de fármacos de molécula grande está severamente limitada por la barrera hematoencefálica (BHE) considerablemente impermeable. Entre las muchas estrategias para superar este obstáculo, está utilizar vías de transporte de transcitos de receptores endógenos expresados en el endotelio capilar cerebral. Se han diseñado proteínas recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales, contra estos receptores para permitir la entrega mediada por el receptor de moléculas grandes al cerebro. Se han abordado estrategias para maximizar la captación cerebral y al mismo tiempo minimizar la transcitosis inversa de vuelta a la sangre, y también maximizar el grado de acumulación después de la dosificación terapéutica, con el hallazgo de que los anticuerpos con baja afinidad por los receptores de la BHE ofrecen el potencial de incrementar sustancialmente el transporte a través de la BHE y la retención en el SNC de restos/moléculas terapéuticos asociados con respecto a anticuerpos típicos de alta afinidad contra dichos receptores (Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011); Yu et al., *Sci. Transl. Med.* 25 de mayo de 2011: vol. 3, Número 84, pág. 84ra44). Sin embargo, esos anticuerpos no se unieron específicamente al TfR humano y de primates.

25 **Sumario**

Los anticuerpos monoclonales tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurológicas o del sistema nervioso central (SNC), pero su paso al cerebro está restringido por la barrera hematoencefálica (BHE). Estudios anteriores han demostrado que un porcentaje muy pequeño (aproximadamente un 0,1 %) de una IgG que circula por el torrente sanguíneo cruza a través de la BHE para llegar al SNC (Felgenhauer, *Klin. Wschr.* 52: 1158-1164 (1974)), donde la concentración del anticuerpo en el SNC puede ser insuficiente para permitir un efecto robusto. Se descubrió previamente que se podía mejorar el porcentaje del anticuerpo que se distribuye en el SNC sacando provecho de los receptores de la BHE (es decir, receptor de transferrina, receptor de insulina y similares) (véase, por ejemplo, el documento WO95/02421). Por ejemplo, el anticuerpo antirreceptor de la BHE se puede hacer multiespecífico para que seleccione como diana uno o más antígenos deseados en el SNC, o se pueden acoplar una o más moléculas heterólogas al anticuerpo antirreceptor de la BHE; en cualquier caso, el anticuerpo antirreceptor de la BHE puede ayudar a administrar una molécula terapéutica en el SNC a través de la BHE.

Sin embargo, la selección como diana de un receptor de la BHE con un anticuerpo de alta afinidad específico tradicional, en general, dio como resultado un incremento limitado en el transporte a través de la BHE. Luego, los solicitantes descubrieron que la magnitud de captación y distribución de anticuerpos en el SNC está inversamente relacionada con su afinidad de unión por el receptor de la BHE entre los anticuerpos anti-BHE estudiados. Por ejemplo, un anticuerpo de baja afinidad contra el receptor de transferrina (TfR) dosificado a niveles de dosis terapéutica mejora en gran medida el transporte a través de la BHE y la retención en el SNC del anticuerpo anti-TfR con respecto a un anticuerpo anti-TfR de mayor afinidad, y hace posible alcanzar más fácilmente concentraciones terapéuticas en el SNC (Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011)). La prueba de dicho transporte a través de la BHE se logró usando un anticuerpo biespecífico que se une tanto a TfR como a la enzima de escisión de la proteína precursora amiloidea (APP), β -secretasa (BACE1). Una dosis sistémica única del anticuerpo biespecífico anti-TfR/BACE1 genomanipulado usando la metodología de la invención no solo dio como resultado una captación significativa de anticuerpos en el cerebro, sino también niveles drásticamente reducidos de $A\beta_{1-40}$ en el cerebro en comparación con anti-BACE1 monoespecífico solo, lo que sugiere que la penetrancia en la BHE afecta a la potencia de anti-BACE1. (Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011); Yu et al., *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra44 (2011)).

Esos datos y experimentos destacaron varios mecanismos causales detrás del incremento de la captación de un anticuerpo en el SNC usando un enfoque de anticuerpo de menor afinidad. En primer lugar, los anticuerpos antirreceptor de la BHE (R-BHE) de alta afinidad (por ejemplo, el anti-TfR^A de Atwal et al. y Yu et al., supra) limitan la captación cerebral saturando rápidamente el R-BHE en la vasculatura cerebral, reduciendo, por tanto, la cantidad total de anticuerpo captado por el cerebro y restringiendo también su distribución a la vasculatura. Sorprendentemente, la reducción de la afinidad por el R-BHE mejora la captación y distribución cerebrales, con un sólido cambio observado en una localización desde la vasculatura a las neuronas y neuropilo asociado distribuido dentro del SNC. En segundo lugar, se propone la menor afinidad del anticuerpo por el R-BHE para alterar la capacidad del anticuerpo de regresar al lado vascular de la BHE por medio del R-BHE desde el lado del SNC de la membrana debido a que la afinidad global del anticuerpo por el R-BHE es baja y la concentración local del anticuerpo en el lado del SNC de la BHE no es saturante debido a la rápida dispersión del anticuerpo en el

compartimento del SNC. En tercer lugar, *in vivo*, y como se observa para el sistema de TfR, los anticuerpos con menos afinidad por el R-BHE no se eliminan del sistema tan eficazmente como los que tienen mayor afinidad por el R-BHE y, por tanto, permanecen a mayores concentraciones circulantes que sus homólogos de mayor afinidad. Esto es ventajoso porque los niveles de anticuerpos circulantes del anticuerpo de menor afinidad se mantienen a niveles terapéuticos durante un periodo de tiempo más largo que el anticuerpo de mayor afinidad que, en consecuencia, mejora la captación de anticuerpo en el cerebro durante un periodo de tiempo más largo. Además, esta mejoría tanto en la exposición de plasma como en la de cerebro puede reducir la frecuencia de dosificación en la clínica, lo que tendría beneficio potencial, no solo para el cumplimiento y la comodidad del paciente, sino también en la disminución de los efectos secundarios potenciales o efectos fuera de la diana del anticuerpo y/o de un compuesto terapéutico acoplado al mismo.

Los anticuerpos anti-R-BHE de baja afinidad descritos en el trabajo mencionado anteriormente se seleccionaron/genomaniplanaron para evitar la interferencia con la unión natural entre la transferrina y el TfR y, por tanto, para evitar efectos secundarios potenciales relacionados con el transporte de hierro. No obstante, tras la administración de determinados de estos anticuerpos en ratones, se observaron algunos efectos secundarios marcados. Los ratones mostraron una respuesta primaria de disminución robusta de las poblaciones de reticulocitos acompañada de síntomas clínicos agudos de aparición rápida. Aunque los ratones se recuperaron tanto de los síntomas clínicos agudos como de los niveles disminuidos de reticulocitos a su debido tiempo, es claramente deseable evitar o mitigar de otro modo este impacto sobre los reticulocitos para que un anticuerpo anti-TfR se pueda usar de forma segura como molécula terapéutica. Se descubrió que la respuesta primaria a la administración de anti-TfR (disminución robusta de reticulocitos y signos clínicos agudos) está impulsada en gran parte por la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) del anticuerpo, mientras que el efecto residual de disminución de reticulocitos está mediada por la vía del complemento.

K. Polakova, M. Karpatova (Neoplasm, 38, 1 1991) describen el anticuerpo monoclonal TR-19 dirigido al receptor de transferrina humano (CD71). Además, este estudio caracteriza el anticuerpo antitransferrina MEM-75 que se une al receptor de transferrina humano distante del sitio de unión de la transferrina.

El documento WO 2012/075037 describe anticuerpos contra el receptor de transferrina que pueden administrar tratamientos a través de la barrera hematoencefálica (BHE). La magnitud de la captación de anticuerpos antitransferrina en el sistema nervioso central a través de la BHE está inversamente relacionada con su afinidad de unión al receptor de transferrina.

Steven M. Paul (Science Translation Medicine, vol. 3, número 84, p. 1 – 5, mayo de 2011) revisa el enfoque para tratar la enfermedad de Alzheimer inhibiendo la enzima β -secretasa (BACE1) usando un anticuerpo monoclonal biespecífico humano que usa transcitososis mediada por receptor para cruzar la barrera hematoencefálica. El anticuerpo biespecífico selecciona como diana tanto BACE1 como el receptor de transferrina humano.

Jessica A. Couch et al. (Science Translation Medicine, vol. 5, número 183, p. 1 – 5, mayo de 2013) describen anticuerpos antirreceptor de transferrina multiespecíficos, en particular un anticuerpo biespecífico dirigido al receptor de transferrina y BACE1. Estos anticuerpos cruzan la barrera hematoencefálica y reconocen el receptor de transferrina humano y de ratón.

Estos estudios anteriores utilizaron anticuerpos de ratón que se unieron específicamente a TfR de ratón, pero que no reconocieron específicamente TfR de primate o humano. En consecuencia, la invención proporciona anticuerpos y partes funcionales de los mismos que reconocen específicamente TfR tanto de primate como humano, para facilitar los estudios de seguridad y eficacia en primates con los anticuerpos antes del uso terapéutico o diagnóstico en seres humanos. Los estudios *in vitro* que usan una línea celular de eritroblastos humanos y células primarias de médula ósea tratadas con los anticuerpos anti-TfR humanos de la invención demostraron que también se puede observar una disminución robusta de células eritroides positivas para TfR en sistemas celulares humanos/de primates como se observa en ratones (véase, por ejemplo, el ejemplo 4). En consecuencia, también se proporcionan en el presente documento modificaciones a los anticuerpos de la invención para reducir o eliminar en gran medida la reducción no deseada de la población de reticulocitos que expresan TfR tras la administración de anti-TfR y al mismo tiempo permitir todavía el transporte potenciado a través de la BHE, la distribución incrementada en el SNC y la retención en el SNC proporcionados por los anticuerpos anti-TfR humanos/de primates administrados en concentraciones terapéuticas. En el presente documento se proporcionan varios enfoques generales para mitigar el efecto observado de los anticuerpos anti-TfR de la invención sobre la disminución de reticulocitos tanto primaria como residual, y se pueden usar solos o en combinación.

En un enfoque, la función efectora del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero se reduce o elimina para reducir o eliminar la actividad de ADCC. En otro enfoque, la afinidad del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero por el TfR humano o de primate se reduce aún más de modo que las interacciones del anticuerpo con la población de reticulocitos son menos perjudiciales para esa población. Un tercer enfoque se dirige a reducir la cantidad de anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero que está presente en el plasma para reducir la exposición de la población de reticulocitos a concentraciones potencialmente perjudiciales del anticuerpo. Un cuarto enfoque busca proteger, estabilizar y/o reponer las poblaciones de reticulocitos de modo que se evite,

reduzca o mitigue cualquier disminución potencial de la población de reticulocitos en circulación o en la médula ósea mediante la administración del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero.

La reducción o eliminación de la función efectora, como se describe en el presente documento, se puede lograr mediante: (i) reducción o eliminación de la glucosilación natural del anticuerpo en mamíferos (por ejemplo, produciendo el anticuerpo en un entorno donde dicha glucosilación no se puede producir, mutando uno o más puntos de fijación de carbohidratos de modo que el anticuerpo no se pueda glucosilar, o retirando química o enzimáticamente uno o más carbohidratos del anticuerpo después de que se ha glucosilado); (ii) mediante reducción o eliminación de la capacidad de unión al receptor de Fc del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero (por ejemplo, mediante mutación de la región Fc, mediante delección dentro de la región Fc o eliminación de la región Fc); o (iii) mediante la utilización de un isotipo de anticuerpo que se sabe que tiene una función efectora mínima o nula (es decir, que incluye, pero sin limitarse a, IgG4).

La disminución de la activación del complemento del anticuerpo, como se describe en el presente documento, se puede lograr mediante la reducción o eliminación de la capacidad de unión a C1q del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero (por ejemplo, mediante mutación de, delección dentro de o eliminación de la región Fc, o modificando la porción no Fc del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero), o suprimiendo de otro modo la activación o actividad del sistema del complemento (por ejemplo, coadministrando uno o más inhibidores de la activación de la vía del complemento o de la actividad de la vía del complemento).

Cuando la unión del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero al TfR humano o de macaco cangrejero en reticulocitos u otros tipos de células que expresan niveles altos de TfR desencadena su disminución, como ocurre con los anticuerpos anti-TfR humano/de macaco cangrejero ejemplificados en el presente documento, la reducción de la unión de los anticuerpos al TfR humano o de macaco cangrejero en los reticulocitos u otros tipos de células debería, a su vez, disminuir la cantidad de disminución de reticulocitos u otros tipos de células en la circulación o en la médula ósea observada tras la administración del anticuerpo. La afinidad del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero por TfR de primate o humano se puede modificar usando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento y como se muestra en los ejemplos.

La reducción de la cantidad de anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero presente en el plasma para reducir la exposición de la población de reticulocitos a concentraciones potencialmente perjudiciales del anticuerpo se puede lograr de varias maneras. Un procedimiento consiste simplemente en disminuir la cantidad del anticuerpo que se dosifica, potencialmente al mismo tiempo que se incrementa la frecuencia de la dosificación, de modo que se reduce la concentración máxima en el plasma, pero se mantiene un nivel sérico suficiente para la eficacia, al mismo tiempo que todavía está por debajo del umbral del efecto secundario de disminución de células. Otro procedimiento, que se puede combinar con modificaciones de dosificación, es seleccionar o genomanipular un anticuerpo anti-TfR que tiene una unión sensible al pH a TfR de modo que se une a la superficie celular de TfR en el plasma a pH 7,4 con una afinidad deseablemente baja como se describe en el presente documento, pero tras la internalización en un compartimento endosómico, dicha unión a TfR se reduce rápida y significativamente al pH relativamente menor de ese compartimento (pH 5,5-6,0). Dicha disociación puede proteger al anticuerpo de la eliminación mediada por antígeno, o incrementar la cantidad de anticuerpo que se administra al SNC o bien se recicla de vuelta a través de la BHE; en cualquier caso, la concentración eficaz del anticuerpo se incrementa con respecto a un anticuerpo anti-TfR que no comprende dicha sensibilidad al pH, sin que se incremente la dosis administrada del anticuerpo y, a su vez, permitiendo potencialmente una dosis menor del anticuerpo con un riesgo concomitantemente menor de efectos secundarios.

La protección, estabilización y/o reposición de poblaciones de reticulocitos se puede lograr usando procedimientos farmacéuticos o físicos. Además del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero, se puede coadministrar al menos un agente terapéutico adicional (simultánea o secuencialmente) que mitigue los efectos secundarios negativos del anticuerpo en las poblaciones de reticulocitos. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, eritropoyetina (EPO), suplementos de hierro, vitamina C, ácido fólico y vitamina B12. El reemplazo físico de glóbulos rojos (es decir, reticulocitos) también es posible mediante, por ejemplo, transfusión con células similares, que pueden ser de otro individuo de tipo sanguíneo similar o se pueden haber extraído previamente del sujeto al que se le administró el anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero.

Un experto en la técnica apreciará que se puede emplear cualquier combinación de los procedimientos anteriores para genomanipular un anticuerpo (y/o una pauta posológica para el mismo) con el equilibrio óptimo entre (i) la afinidad deseablemente baja por el TfR de primate o humano que maximizará el transporte del anticuerpo y de cualquier compuesto conjugado al SNC; (ii) la afinidad del compuesto conjugado (incluyendo, como ejemplo no limitante, una segunda u otra especificidad de unión al antígeno en el anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero) por su antígeno del SNC, ya que esto es relevante para la cantidad del compuesto que necesita estar presente en el SNC para tener un efecto terapéutico; (iii) la tasa de eliminación del anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero; (iv) la labilidad del anti-TfR/compuesto conjugado a pH bajo para facilitar la liberación del compuesto conjugado en el lado del SNC/cerebro de la BHC, y (v) el impacto sobre las poblaciones de reticulocitos.

También se apreciará que el efecto de disminución de reticulocitos reconocido en el presente documento de la

administración de anticuerpos anti-TfR puede ser útil en el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno donde la proliferación excesiva de reticulocitos sea problemática. Por ejemplo, en la policitemia congénita o la policitemia vera neoplásica, los recuentos elevados de glóbulos rojos debido a la hiperproliferación de, por ejemplo, reticulocitos, dan como resultado un espesamiento de la sangre y síntomas fisiológicos concomitantes. La administración de un anticuerpo anti-TfR humano/de macaco cangrejero de la invención en el que se conserva al menos función efectora parcial del anticuerpo permitiría la retirada selectiva de poblaciones de reticulocitos inmaduros sin afectar al transporte normal de transferrina al SNC. La dosificación de dicho anticuerpo se podría modular de modo que los síntomas clínicos agudos se pudieran minimizar (es decir, dosificando a una dosis muy baja o a intervalos ampliamente espaciados), como se entiende bien en la técnica.

Anti-TfR/BACE1 y anti-TfR/Abeta son candidatos terapéuticos prometedores y novedosos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Además, la tecnología de diana biespecífica basada en el transporte mediado por receptores (TMR) abre la puerta a una amplia gama de agentes terapéuticos potenciales para las enfermedades del SNC. La invención proporciona procedimientos de genomaniplulación de tratamientos que penetran en la BHE que mejoran de modo que los síntomas clínicos agudos se pudieran minimizar (es decir, dosificando a una dosis muy baja o a intervalos ampliamente espaciados), como se entiende bien en la técnica.

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En consecuencia, en un primer modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une al receptor de transferrina humana (TfR) y a TfR de primate, en el que el anticuerpo no inhibe la unión de transferrina al TfR, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 153 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 105. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En otro aspecto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a TfR humano y a TfR de primate.

En un aspecto del modo de realización anterior, el anticuerpo se acopla a un compuesto terapéutico. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto terapéutico opcionalmente forma una porción del anticuerpo multiespecífico. En uno de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a TfR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral. En uno de dichos aspectos, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), tau, apolipoproteína E (ApoE), 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 amiloidea (APP), receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), y caspasa 6. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otro de dichos aspectos, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro de dichos aspectos, el compuesto terapéutico es un fármaco para trastornos neurológicos. Cualquier referencia en la descripción a procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) por tratamiento (o para diagnóstico).

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una estructura cristalina tridimensional de un dímero de TfR en complejo con Tf, en base al archivo pdb 3SM9. La región apical de TfR que no se une a Tf está marcada.

Las figuras 2A-2B representan el análisis por FACS de sobrenadantes de clones originales de hibridoma de ratón que se unen a TfR humano y de macaco cangrejero expresado de forma transitoria en células 293 en presencia de holo-Tf humano 1 µM. A menos que se indique de otro modo, el trazo gris relleno en cada gráfico es el fondo del anticuerpo de detección, el trazo gris medio se une a células 293 que expresan de forma endógena niveles basales de TfR humano, el trazo negro en negrita representa la unión a TfR humano expresado de forma transitoria y el trazo gris fino representa la unión a TfR de macaco cangrejero expresado de forma transitoria.

La figura 2C representa los resultados de los ensayos de competencia de anticuerpos con reacción cruzada de humano/macaco cangrejero como se describe en el ejemplo 1. Se encontró que nueve de los catorce clones bloqueaban la unión del anticuerpo de unión apical presentado en el fago.

Las figuras 3A-1, 3A-2, 3B-1, 3B-2, 3C-1, 3C-2, 3D-1 y 3D-2 representan las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de clones de hibridoma que se unen a regiones apicales y no apicales de TfR. Las secuencias se pueden subdividir además por epítipo y similitud de secuencia en clase I-III (aglutinantes apicales) y clase IV (aglutinantes no apicales). Las HVR de acuerdo con Kabat se indican por subrayado.

Las figuras 4A-1, 4A-2, 4B-1, 4B-2, 4C-1, 4C-2, 4D-1 y 4D-2 representan alineamientos de secuencias humanizadas para (A) 15G11, (B) 7A4/8A2, (C) 7G7 y (D) 16F6. Cada secuencia de dominio variable ligero o

pesado de ratón (segunda línea) está alineada con la línea germinal humana más cercana o el dominio variable de consenso (primera línea). La versión humanizada de cada anticuerpo se muestra en la parte inferior (tercera línea). Las diferencias respecto a la línea germinal humana o las secuencias consenso están sombreadas. Las secuencias de HVR que se injertaron en la región estructural humana están encuadradas. Se indican las definiciones de CDR de acuerdo con Kabat.

Las figuras 4E-1 y 4E-2 muestran que, para los grupos de anticuerpos de clase I-III, las formas variantes de los anticuerpos con modificaciones en uno o más residuos de una FR retuvieron la afinidad y la especificidad de unión.

La figura 5 representa la unión de hu7A4.v15, hu15G11.v5 y hu7G7.v1 a huTfR en presencia de holo-Tf 6,3 μ M. La unión del anticuerpo a huTfR inmovilizado se muestra en presencia (símbolos abiertos y líneas discontinuas) o ausencia (símbolos rellenos y líneas continuas) de holo-Tf 6,3 μ M.

Las figuras 6A-B representan los resultados de la unión HFE-HuTfR y los ensayos de bloqueo de HFE descritos en el ejemplo 1. La figura 6A muestra la unión del anticuerpo a concentraciones que se incrementan de huTfR capturado por medio de HFE inmovilizada. La figura 6B muestra la unión de huTfR a HFE inmovilizada en presencia de concentraciones que se incrementan de anticuerpo.

Las figuras 7A-B representan análisis de unión de IgG 15G11.v5 y 7A4.v5 y variantes Fab Ala en TfR de macaco cangrejero y humano, que demuestran los efectos sobre la afinidad de las mutaciones de Ala en CDR-L3 y CDR-H3 de cada anticuerpo evaluado como IgG mediante unión por ELISA e IgG o Fab mediante análisis de SPR para TfR inmovilizado humano o de macaco cangrejero, como se describe en el ejemplo 2.

Las figuras 8A-B y las Figuras 9A-B representan los resultados de experimentos que evalúan el impacto del estado de la función efectora sobre la actividad de ADCC de anticuerpos anti-TfR humano ("anti-hTFR") en células mononucleares primarias de médula ósea humana o en una línea celular de eritroblastos humanos, como se describe en el ejemplo 4.

La figura 10 representa la dosificación y esquema de muestreo para el estudio con primates descrito en el ejemplo 5.

Las figuras 11A-11B representan los resultados farmacocinéticos de los experimentos descritos en el ejemplo 5, específicamente las concentraciones séricas medias individuales y grupales de anti-TfR1/BACE1, anti-TfR2/BACE1 y anti-gD frente al tiempo después de una única administración en bolo i.v. a 30 mg/kg en macacos cangrejeros en suero (figura 11A) y LCR (figura 11B).

Las figuras 12A-12E representan los resultados farmacodinámicos de los experimentos descritos en el ejemplo 5, específicamente las concentraciones medias individuales y grupales de anti-TfR1/BACE1, anti-TfR2/BACE1 y anti-gD en plasma (A) o LCR (B-E) frente al tiempo después de una única administración en bolo i.v. a 30 mg/kg en macacos cangrejeros. Los paneles superiores muestran los niveles de Abetal-40 en plasma (figura 12A) y LCR (figura 12B), mientras que los paneles inferiores muestran niveles de APP α soluble (figura 12C), niveles de APP β soluble (figura 12D) y proporción sAPP β /sAPP α (figura 12E) a lo largo del tiempo.

Las figuras 13A-13D representan los resultados del muestreo hematológico realizado durante los estudios descritos en el ejemplo 5. En cada uno de los puntos de tiempo indicados, se midieron los reticulocitos totales (figura 13A), los glóbulos rojos (Figura 13B), la hemoglobina (figura 13D) y el porcentaje de reticulocitos inmaduros en el conjunto de reticulocitos totales (figura 13C) usando técnicas estándar.

La figura 14 representa la dosificación y esquema de muestreo para el estudio con primates descrito en el ejemplo 6.

Las figuras 15A-15B representan los resultados farmacodinámicos (A) y las concentraciones cerebrales de anticuerpos (B) de los experimentos descritos en el ejemplo 6. Específicamente, la figura 15A muestra la proporción media individual y grupal de anti-TfR1/BACE1, anti-TfR2/BACE1, anti-gD y anti-BACE1 de sAPP β /sAPP α en LCR frente al tiempo después de una única administración en bolo i.v. a 30 mg/kg en macacos cangrejeros. La figura 15B muestra concentraciones individuales de anticuerpo anti-TfR1/BACE1, anti-TfR2/BACE1, anti-gD y anti-BACE1 en diversas regiones cerebrales a las 24 horas después de la dosis.

Las figuras 16A-B representan las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada del clon YW412.8 anti-BACE1 obtenido de una categoría no expuesta de la biblioteca de presentación en fagos de diversidad natural y formas de afinidad madurada de YW412.8. La fig. 16A representa las alineaciones de secuencias de la cadena ligera variable (VL) (SEQ ID NO 132-137). La fig. 16B representa las alineaciones de secuencias de la cadena pesada variable (VH) (SEQ ID NO 138-139). En ambas figuras, las secuencias de HVR para cada clon se indican por las regiones enmarcadas, indicando el primer recuadro HVR-L1 (fig. 16A) o HVR-H1 (fig. 16B), indicado el segundo recuadro HVR-L2 (fig. 16A) o HVR-H2 (fig. 16B) e indicando el tercer recuadro HVR-L3 (fig. 16A) o H3 (fig. 16B).

Las figuras 17A-B representan las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada del clon Fab 12 del anticuerpo anti-BACE1 obtenido de una categoría no expuesta de la biblioteca de presentación en fagos de diversidad sintética y formas de afinidad madurada de Fab 12. La fig. 17A representa las alineaciones de secuencias de la cadena ligera (SEQ ID NO 140-143). La fig. 17B representa las alineaciones de secuencias de la cadena pesada (SEQ ID NO: 144). En ambas figuras, las secuencias de HVR para cada clon se indican por las regiones enmarcadas, indicando el primer recuadro HVR-L1 (fig. 17A) o HVR-H1 (fig. 17B), indicado el segundo recuadro HVR-L2 (fig. 17A) o HVR-H2 (fig. 17B) e indicando el tercer recuadro HVR-L3 (fig. 17A) o HVR-H3 (fig. 17B).

Las figuras 18A-B representan la cadena pesada (fig. 18A; SEQ ID NO. 145) y la cadena ligera (fig. 18B; SEQ ID NO. 146) de un anticuerpo anti-Abeta ejemplar.

La figura 19 representa las propiedades farmacocinéticas de anti-TfR1/BACE1, anti-TfR52A/BACE1 y anti-TfR53A/BACE1 como se describe en el ejemplo 5.

La figura 20 representa las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos IgG2a anti-TfRD/BACE1 y Anti-gD murinos con las mutaciones LALAPG de la función efectora de Fc como se describe en el ejemplo 7.

La figura 21 representa el recuento de reticulocitos totales e inmaduros en ratones 24 horas después de la administración de una dosis de 50 mg/kg de los anticuerpos IgG2a anti-TfRD/BACE1 y Anti-gD murinos con las mutaciones LALAPG de la función efectora de Fc como se describe en el ejemplo 7.

La figura 22 representa el recuento de reticulocitos totales en ratones 24 horas después de la administración de una dosis de 50 mg/kg de los anti-TfR52A/BACE1 (N297G), anti-TfR52A/BACE1 (LA-LAPG), anti-TfR52A/BACE1 (LALAPG/YTE). Anticuerpos TfR52A/BACE1 (LALAPG/AI) en ratones con inserción génica del receptor de transferrina humana como se describe en el ejemplo 8.

La figura 23 representa los resultados de experimentos que evalúan el impacto del estado de la función efectora sobre la actividad de ADCC de anticuerpos anti-TfR/gD, anti-TfR/BACE1 (N297G), anti-TfR/BACE1 (LA-LAPG), anti-TfR/BACE1 (N297G/434A/436I) y anti-TfR/BACE1 (LALAPG/YTE) en células mononucleares primarias de médula ósea humana o en una línea celular de eritroblastos humanos, como se describe en el ejemplo 8.

La figura 24 representa las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de 1511Gv.5 (cadena ligera – SEQ ID NO: 105 y cadena pesada – SEQ ID NO: 108) y variantes de afinidad 15G11.52A (cadena ligera – SEQ ID NO: 105 y cadena pesada – SEQ ID NO: 153), 15G11.53 A (cadena ligera – SEQ ID NO: 105 y cadena pesada – SEQ ID NO: 154) y 15G11.92A (cadena ligera – SEQ ID NO: 151 y cadena pesada – SEQ ID NO: 108). Las HVR de acuerdo con Kabat se indican por subrayado.

La figura 25 representa un ensayo de competencia entre 15G11V.5 y anti-TfRC12 como se describe en el ejemplo 1.

Descripción detallada de modos de realización de la invención

1. Definiciones

"Afinidad" se refiere a la intensidad de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera Y se puede representar, en general, mediante la constante de disociación (KD, que es una proporción entre la tasa de salida de X de Y (kd o Kdis) y la tasa de entrada de X a Y (ka o kas)). Una medición sustitutiva de la afinidad de uno o más anticuerpos por su diana es su concentración inhibidora máxima media (CI50), una medida de la cantidad de anticuerpo que se necesita para inhibir la unión de un ligando conocido a la diana del anticuerpo en un 50 %. La afinidad se puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en el presente documento. La "barrera hematoencefálica" o "BHE" se refiere a la barrera fisiológica existente entre la circulación periférica y el cerebro y la médula espinal (es decir, el SNC) que está formada por uniones estrechas dentro de las membranas plasmáticas del endotelio capilar del cerebro, creando una barrera estrecha que restringe el transporte de moléculas al cerebro, incluso de moléculas muy pequeñas tales como urea (60 daltons). La barrera hematoencefálica 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 la barrera hematoencefálica o BHE. La BHE también engloba la barrera hematocefalorraquídea (plexo coroideo) donde la barrera está compuesta de endotelios en lugar de células endoteliales de los capilares.

Los términos "beta amiloide", "beta-amiloide", "Abeta", " β amiloide" y "A β ", usados de manera intercambiable en el presente documento, se refieren al fragmento de la proteína precursora amiloidea ("APP") que se produce tras la escisión de APP por la β -secretasa 1 ("BACE1"), así como modificaciones, fragmentos y cualquier equivalente funcional de los mismos, incluyendo, pero sin limitarse a, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂. Es conocido que A β existe en forma monomérica, así como que se asocia para formar oligómeros y estructuras de fibrillas, que se pueden encontrar como miembros constituyentes de la placa de amiloide. La estructura y secuencias de dichos péptidos A β son bien conocidas para un experto en la técnica y los procedimientos para producir dichos péptidos o para extraerlos del cerebro y otros tejidos se describen, por ejemplo, en Glenner y Wong, *Biochem Biophys Res. Comm.* 129: 885-890 (1984). Además, los péptidos A β también están disponibles comercialmente en diversas formas. "Inmunoglobulina anti-Abeta", "anticuerpo anti-Abeta" y "anticuerpo que se une a Abeta" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un anticuerpo que se une específicamente a Abeta humano. Un ejemplo no limitante de un anticuerpo anti-Abeta es crenezumab. Otros ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-Abeta son solanezumab, bapineuzumab, gantenerumab, aducanumab, ponezumab y cualquier anticuerpo anti-Abeta divulgado en las siguientes publicaciones: Documentos WO2000162801, WO2002046237, WO2002003911, WO2003016466, WO2003016467, WO2003077858, WO2004029629, WO2004032868, WO2004032868, WO2004108895, WO2005028511, WO2006039470, WO2006036291, WO2006066089, WO2006066171, WO2006066049, WO2006095041, WO2009027105.

Los términos "crenezumab" y "MABT5102A" se usan de manera intercambiable en este documento y se refieren a un anticuerpo anti-Abeta específico que se une a las formas monoméricas, oligoméricas y de fibrilla de Abeta, y que está asociado con el número de registro CAS 1095207. En un modo de realización, dicho anticuerpo comprende secuencias expuestas en las figuras 18A y 18B.

"Portador de apolipoproteína E4" o "portador de ApoE4", usados de manera intercambiable en el presente documento con "positivo para apolipoproteína E4" o "positivo para ApoE4", se refiere a un individuo que tiene al menos un alelo de apolipoproteína E4 (o "ApoE4"). En el presente documento se hace referencia a un individuo con cero alelos de ApoE4 como "negativo para ApoE4" o "no portador de ApoE4". Véase también Prekumar, et al., 1996, *Am. J Pathol.* 148:2083-95.

El término "edema angiogénico cerebral" se refiere a una acumulación excesiva de fluido o proteína intravascular en los espacios intracelulares o extracelulares del cerebro. El edema angiogénico cerebral es detectable por, por ejemplo, RM cerebral, incluyendo, pero sin limitarse a, RM FLAIR, y puede ser asintomático ("edema vasogénico asintomático") o estar asociado con síntomas neurológicos, tales como confusión, mareo, vómitos y letargo ("edema angiogénico sintomático") (véase Sperling et al. *Alzheimer's & Dementia*, 7:367, 2011).

El término "macrohemorragia cerebral" se refiere a una hemorragia intracraneal, o sangrado en el cerebro, de un área que tiene más de aproximadamente 1 cm de diámetro. La macrohemorragia cerebral es detectable por, por ejemplo, RM cerebral, incluyendo, pero sin limitarse a, RM GRE ponderada en T2*, y puede ser asintomática ("macrohemorragia asintomática") o estar asociada con síntomas tales como deterioro focal motor o sensitivo transitorio o permanente, ataxia, afasia y disartria ("macrohemorragia sintomática") (véase, por ejemplo, Chalela JA, Gomes J. *Expert Rev. Neurother.* 2004 4:267, 2004 y Sperling et al. *Alzheimer's & Dementia*, 7:367, 2011).

El término "microhemorragia cerebral" se refiere a una hemorragia intracraneal, o sangrado en el cerebro, de un área que tiene menos de aproximadamente 1 cm de diámetro. La microhemorragia cerebral es detectable por, por ejemplo, RM, incluyendo, pero sin limitarse a, RM GRE ponderada en T2*, y puede ser asintomática ("microhemorragia asintomática") o se puede asociar potencialmente con síntomas tales como deterioro focal motor o sensitivo transitorio o permanente, ataxia, afasia y disartria ("microhemorragia sintomática"). Véase, por ejemplo, Greenberg, et al., 2009, *Lancet Neurol.* 8:165-74.

El término "derrame sulcal" se refiere a un derrame de fluido en los pliegues, o surcos, del cerebro. Los derrames sulcales son detectables por, por ejemplo, RM cerebral, incluyendo, pero sin limitarse a, MR FLAIR. Véase Sperling et al. *Alzheimer's & Dementia*, 7:367, 2011.

El término "siderosis superficial del sistema nervioso central" se refiere a sangrado o hemorragia en el espacio subaracnoideo del cerebro y es detectable por, por ejemplo, RM cerebral, incluyendo, pero sin limitarse a, RM GRE ponderada en T2*. Los síntomas indicativos de siderosis superficial del sistema nervioso central incluyen sordera neurosensitiva, ataxia cerebelosa y signos piramidales. Véase Kumara-N, *Am J Neuroradiol.* 31:5, 2010.

El término "amiloidosis", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o similares a amiloide e incluye, pero no se limita a, enfermedades y trastornos causados por la presencia o actividad de proteínas similares a amiloide en estado monomérico, de fibrilla o polimérico, o cualquier combinación de los tres, incluyendo por placas de amiloide.

Dichas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis secundaria y amiloidosis senil, tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitarse a, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer ("EA"), enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva tales como,

por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), complejo Parkinson-Demencia de Guam y otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de inicio en la edad adulta, tumores endocrinos y amiloidosis cardíaca senil, y diversas enfermedades oculares, incluyendo degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusas, glaucoma y cataratas debido a depósito de beta-amiloide.

El glaucoma es un grupo de enfermedades del nervio óptico que implican pérdida de células ganglionares de la retina (CGR) en un patrón característico de neuropatía óptica. Las CGR son las células nerviosas que transmiten señales visuales desde el ojo al cerebro. La caspasa-3 y la caspasa-8, dos enzimas principales en el proceso apoptótico, se activan en el proceso que da lugar a la apoptosis de las CGR. La caspasa-3 escinde la proteína precursora amiloidea (APP) para producir fragmentos neurotóxicos, incluyendo Abeta. Sin el efecto protector de la APP, la acumulación de Abeta en la capa de células ganglionares de la retina da como resultado la muerte de las CGR y una pérdida irreversible de visión.

El glaucoma a menudo es acompañado, pero no siempre, de una presión ocular incrementada, que puede ser el resultado de un bloqueo de la circulación de acuoso, o su drenaje. Aunque la presión intraocular elevada es un factor de riesgo significativo para desarrollar glaucoma, no se puede definir ningún umbral de presión intraocular que sea determinante para provocar glaucoma. El daño también puede estar provocado por un riego sanguíneo deficiente a las fibras vitales del nervio óptico, una debilidad en la estructura del nervio y/o un problema en la salud de las propias fibras nerviosas. El glaucoma no tratado da lugar a daño permanente del nervio óptico y la resultante pérdida de campo visual, que puede progresar a ceguera.

El término "enfermedad de Alzheimer leve" o "EA leve" como se usa en el presente documento (por ejemplo, un "paciente diagnosticado de EA leve") se refiere a una fase de la EA caracterizada por una puntuación MMSE de 20 a 26.

El término "enfermedad de Alzheimer de leve a moderada" o "EA de leve a moderada", como se usa en el presente documento, engloba la EA tanto leve como moderada y se caracteriza por una puntuación MMSE de 18 a 26.

El término "enfermedad de Alzheimer moderada" o "EA moderada" como se usa en el presente documento (por ejemplo, un "paciente diagnosticado de EA moderada") se refiere a una fase de la EA caracterizada por una puntuación MMSE de 18 a 19.

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

Un "receptor de la barrera hematoencefálica" (abreviado "R-BHE" en el presente documento) es una proteína de receptor transmembrana expresada en las células endoteliales del cerebro, que es capaz de transportar moléculas a través de la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de R-BHE incluyen, pero no se limitan a, receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF-R), receptores de lipoproteínas de baja densidad que incluyen, 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), transportador de glucosa 1 (Glut1) y factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). Un ejemplo de R-BHE en el presente documento es el receptor de transferrina (TfR).

El término "receptor de transferrina" o "TfR", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier TfR natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba TfR sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de TfR que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de TfR, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. El 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 en el presente documento es TfR humano ("hTfR") que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en Schneider et al. Nature 311: 675 - 678 (1984), por ejemplo (SEQ ID NO: 1). En otro modo de realización, el TfR en el presente documento es TfR de primate ("pTfR") que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la referencia de Genbank AFD18260.1 (SEQ ID NO: 2). A modo de comparación, la secuencia de TfR de ratón se puede encontrar en la referencia de Genbank AAH54522.1 (SEQ ID NO: 3).

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. Las enfermedades o trastornos del SNC ejemplares 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 propósitos 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 sin limitarse a, enfermedad con cuerpos de Lewy, síndrome de pospoliomielitis, síndrome de Shy-Draeger, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Parkinson, atrofia de múltiples sistemas, degeneración estriatonigral, tauopatías (incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear), enfermedades priónicas (incluyendo, pero sin limitarse 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 sin limitarse 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 sin limitarse a, enfermedad de Pick y ataxia espinocerebelosa), cáncer (por ejemplo, del SNC, incluyendo 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, 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 fármacos ejemplares 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 sin limitarse a, proteína precursora amiloidea o porciones de la misma, amiloide beta, beta-secretasa, gamma-secretasa, tau, alfa-sinucleína, parkina, huntingtina, DR6, presenilina, ApoE, marcadores de glioma u otro cáncer del SNC y neurotrofinas. Se proporcionan ejemplos no limitantes de fármacos para trastornos neurológicos y los trastornos en los que se pueden usar como tratamiento en la siguiente tabla 1:

TABLA 1: Ejemplos no limitantes de fármacos para trastornos neurológicos y los trastornos correspondientes en los que se pueden usar como tratamiento

Fármaco	Trastorno neurológico
Anticuerpo anti-BACE1	Enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral aguda y crónica, apoplejía
Anticuerpo anti-Abeta	Enfermedad de Alzheimer
Anticuerpo anti-tau	Enfermedad de Alzheimer, tautopatías
Neurotrofina	Apoplejía, lesión cerebral aguda, lesión de la médula espinal
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2)	Lesión cerebral crónica (neurogénesis)
Anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	Cáncer de cerebro
Factor neural derivado de la línea celular glial (GDNF)	Enfermedad de Parkinson
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	Esclerosis lateral amiotrófica, depresión
Enzima lisosómica	Trastornos de almacenamiento lisosómico del cerebro
Factor neurotrófico ciliar (CNTF)	Esclerosis lateral amiotrófica
Neurregulina 1	Esquizofrenia
Anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, trastuzumab, pertuzumab, etc.)	Metástasis cerebral de cáncer positivo para HER2
Anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab)	Glioblastoma recidivante o recién diagnosticado, glioma maligno recidivante, metástasis cerebral

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 un resto marcado que permite la detección.

Un "antígeno del SNC" o "antígeno cerebral" es un antígeno expresado en el SNC, incluyendo el cerebro, que se puede seleccionar como diana con un anticuerpo o una molécula pequeña. Los ejemplos de dichos antígenos incluyen, sin limitación, beta-secretasa 1 (BACE1), amiloide beta (Abeta), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (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 amiloidea (APP), receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), receptor de interleucina 6 (IL6R), receptor de TNF 1 (TNFR1),

interleucina 1 beta (IL1 β) y caspasa 6. En un modo de realización, el antígeno es BACE1.

El término "BACE1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier beta-secretasa 1 natural (también llamada enzima 1 que escinde la proteína precursora amiloidea del sitio β , proteasa aspártica asociada a membrana 2, memapsina 2, aspartil proteasa 2 o Asp2) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba BACE1 no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de BACE1 que resulta del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de BACE1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de BACE1 ejemplar es la secuencia para BACE1 humana, isoforma A como se informa en Vassar et al., Science 286:735-741 (1999). Existen otras varias isoformas de BACE1 humana, incluyendo las isoformas B, C y D. Véase UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817.

Los términos "anticuerpo anti-beta-secretasa", "anticuerpo anti-BACE1", "un anticuerpo que se une a beta-secretasa" y "un anticuerpo que se une a BACE1" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a BACE1 con una afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico dirigido a BACE1. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-BACE1 a una proteína distinta de BACE1 no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a BACE1 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a BACE1 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, de 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-BACE1 se une a un epítipo de BACE1 que se conserva en BACE1 de diferentes especies e isoformas. En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo que se une al epítipo en BACE1 unido por el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31. En otros modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un exosito dentro de BACE1 localizado en el dominio catalítico de BACE1. En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo que compite con los péptidos identificados en Kornacker et al., Biochem. 44:11567-11573 (2005), (es decir, péptidos 1, 2, 3, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-12, 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 4, 5, 6, 5-10, 5-9, aleatorios, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A y L11 A) para unirse a BACE1. Secuencias ejemplares de anticuerpo contra BACE1 se representan en la fig. 15A-B y fig. 16A-B. Un anticuerpo ejemplar en el presente documento comprende los dominios variables del anticuerpo YW412.8.31 (por ejemplo, como en las figs. 15A-B).

Una proteína con "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 que se produce de forma recombinante.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Nelson, MAbs (2010) 2(1): 77-83) e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla que incluyen, pero sin limitarse a, fragmentos variables de cadena única (scFv), fusiones de dominios de unión a antígeno de la cadena ligera y/o pesada con o sin un conector (y opcionalmente en tándem); y moléculas de unión a antígeno monoespecíficas o multispecíficas formadas a partir de fragmentos de anticuerpos (incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos multispecíficos contruidos a partir de múltiples dominios variables que carecen de regiones Fc).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes dichas variantes en general en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, que incluyen, pero sin limitarse a, el procedimiento del hibridoma (véase, por ejemplo, Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. nº 4.816.567), procedimientos de presentación en fagos (por ejemplo, usando las técnicas descritas en Clackson et

al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)), y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para elaborar anticuerpos monoclonales. Los ejemplos específicos de anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos quiméricos, 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 porción 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)).

Una "región estructural humana aceptadora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptadora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptadora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos aminoacídicos que se producen más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación del NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., *supra*.

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 anticuerpos humanos (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 tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Por ejemplo, en determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales (FR) corresponden a las de un anticuerpo humano. En algunos casos, se reemplazan residuos de FR de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Se pueden realizar estas modificaciones para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables se corresponden con las de un anticuerpos no humano y todas o sustancialmente todas las FR son las de un anticuerpo humano, excepto la(s) sustitución(ones) de FR como se indica anteriormente. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo, típicamente la de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización. Para otros 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 un anticuerpo que comprende una estructura de secuencia de aminoácidos que se corresponde con la estructura de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Dichos anticuerpos se pueden identificar o elaborar mediante una variedad de técnicas que incluyen, pero sin limitarse a: producción por animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de 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); 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); 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 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 epitopos diferentes. Los anticuerpos multiespecíficos ejemplares se pueden unir tanto a un Tfr 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 en el 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 (incrementadas o disminuidas) (véanse, por ejemplo, el documento WO 00/42072, Presta, L. y el documento WO 99/51642, Iduosogie et al.); y/o una semivida sérica incrementada 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 estructurales de un anticuerpo original (por ejemplo, de un anticuerpo original quimérico, humanizado o humano) que alteran (incrementan o reducen) la afinidad. 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 aminoacídicas en cada sitio. Por tanto, las variantes de anticuerpo 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 a continuación 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 contribuyen 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.

Una "variante de anticuerpo sensible al pH" es una variante de anticuerpo que tiene una afinidad de unión diferente por un antígeno diana a un primer pH que la que tiene por ese antígeno diana a un pH diferente. Como ejemplo no limitante, un anticuerpo anti-Tfr de la invención se puede seleccionar o genomanipular para que tenga una unión sensible al pH a Tfr de modo que se una con una afinidad deseablemente baja (como se describe en el presente documento) a Tfr de la superficie celular en el plasma a pH 7,4, pero tras la internalización en un compartimento endosómico, se disocia rápidamente de Tfr a un pH relativamente menor (pH 5,5-6,0); dicha disociación puede proteger al anticuerpo de la eliminación mediada por antígeno e incrementar la cantidad de anticuerpo que se administra al SNC o bien se recicla de vuelta a través de la BHE; en cualquier caso, la concentración eficaz del anticuerpo se incrementa con respecto a un anticuerpo anti-Tfr que no comprende dicha sensibilidad al pH (véase, por ejemplo, Chaparro-Riggers et al. J. Biol. Chem. 287(14): 11090-11097; Igawa et al., Nature Biotechnol. 28(11): 1203-1208). La combinación deseada de afinidades al pH sérico y al pH del compartimento endosómico se puede determinar fácilmente para un Tfr y un compuesto conjugado por un experto en la técnica.

El anticuerpo del presente documento se puede conjugar con una "molécula heteróloga", por ejemplo, para incrementar la semivida o la estabilidad o para mejorar de otro modo el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede enlazar a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Los fragmentos de anticuerpo, tales como Fab', enlazados a una o más moléculas de PEG, son un modo de realización ejemplar de la invención. En otro ejemplo, la molécula heteróloga es un compuesto terapéutico o un agente de visualización (es decir, un marcador detectable), y el anticuerpo se usa para transportar dicha molécula heteróloga a través de la BHE. Los ejemplos de moléculas heterólogas incluyen, pero no se limitan a, un compuesto químico, un péptido, un polímero, un lípido, un ácido nucleico y una proteína.

El anticuerpo en el presente documento puede ser una "variante de glucosilación" de modo que cualquier

carbohidrato fijado a la región Fc, si está presente, se altera, modifica en presencia/ausencia o bien modifica en tipo. 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, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se referencian anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) de bisección en el carbohidrato 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 carbohidratos 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. La mutación de la secuencia consenso de glucosilación en la región Fc (Asn-X-Ser/Thr en las posiciones 297-299, donde X no puede ser prolina), por ejemplo mutando la Asn de esta secuencia a cualquier otro aminoácido, colocando un Pro en la posición 298, o modificando la posición 299 a cualquier aminoácido distinto de Ser o Thr debe anular la glucosilación en esa posición (véase, por ejemplo, Fares Al-Ejeh et al., Clin. Cancer Res. (2007) 13:5519s-5527s; Imperiali y Shannon, Biochemistry (1991) 30(18): 4374-4380; Katsuri, Biochem J. (1997) 323(Pt 2): 415-419; Shakin-Eshleman et al., J. Biol. Chem. (1996) 271: 6363-6366).

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos en contacto con el antígeno ("contacto con el antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR ejemplares en el presente documento incluyen:

- (a) los bucles hipervariables que se producen en los residuos aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));
- (b) las CDR que se producen en los residuos aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));
- (c) los contactos con el antígeno que se producen en los residuos aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), y 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)); y
- (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), que incluyen los residuos aminoácidos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

En un modo de realización, los residuos de HVR comprenden los identificados en las figuras 3 AD o 4A-D, la tabla 4 o la tabla 5 o en cualquier otro lugar de la memoria descriptiva.

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat et al., supra.

Los residuos de la "región estructural" o "FR" son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento. 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. En determinados modos de realización, se pueden modificar uno o más residuos de FR para modular la estabilidad del anticuerpo o para modular el posicionamiento tridimensional de una o más HVR del anticuerpo para, por ejemplo, potenciar la unión.

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

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por

ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150 000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen con disulfuro. Del extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, del extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Las "funciones efectoras" de los anticuerpos se refieren a aquellas actividades biológicas de un anticuerpo que dan como resultado una activación del sistema inmunitario distinta de la activación de la vía del complemento. Dichas actividades se encuentran en gran medida en la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen, por ejemplo, unión al receptor de Fc y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En un modo de realización, el anticuerpo en el presente documento carece esencialmente de función efectora. En otro modo de realización, el anticuerpo en el presente documento retiene una función efectora mínima. Los procedimientos de modificación o eliminación de la función efectora son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, eliminar toda o una porción de la región Fc responsable de la función efectora (es decir, usar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo en un formato que carece de toda o una porción de la región Fc tal como, pero sin limitarse a, un fragmento Fab, un anticuerpo monocaténario y similares como se describe en el presente documento y como es conocido en la técnica; modificar la región Fc en una o más posiciones de aminoácidos para eliminar la función efectora (unión a Fc-impactar: posiciones 238, 239, 248, 249, 252, 254, 256, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 311, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 436, 437, 438 y 439; y modificar la glucosilación del anticuerpo (incluyendo, pero sin limitarse a, producir el anticuerpo en un entorno que no permite la glucosilación natural en mamíferos, retirar uno o más grupos de carbohidratos de un anticuerpo ya glucosilado y modificar el anticuerpo en una o más posiciones de aminoácidos para eliminar la capacidad de que el anticuerpo sea glucosilado en esas posiciones (incluyendo, pero sin limitarse, N297G y N297A y D265A).

Las funciones de "activación del complemento" de los anticuerpos, o las propiedades de un anticuerpo que posibilitan o desencadenan la "activación de la vía del complemento" se usan de manera intercambiable y se refieren a aquellas actividades biológicas de un anticuerpo que activan o estimulan la vía del complemento del sistema inmunitario en un sujeto. Dichas actividades incluyen, por ejemplo, unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y pueden estar mediadas tanto por la porción Fc como por la porción no Fc del anticuerpo. Los procedimientos de modificación o eliminación de la función de activación del complemento son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, eliminar toda o una porción de la región Fc responsable de la activación del complemento (es decir, usar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo en un formato que carece de toda o una porción de la región Fc tal como, pero sin limitarse a, un fragmento Fab, un anticuerpo monocaténario y similares como se describe en el presente documento y como es conocido en la técnica, o modificar la región Fc en una o más posiciones de aminoácidos para eliminar o disminuir las interacciones con componentes del complemento o la capacidad de activar componentes del complemento, tal como las posiciones 270, 322, 329 y 321, conocidas por estar implicadas en la unión a C1q), y modificar o eliminar una porción de la región no Fc responsable de la activación del complemento (es decir, modificar la región CH1 en la posición 132 (véase, por ejemplo, Vidarte et al., (2001) J. Biol. Chem. 276(41): 38217-38223)).

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa se pueden asignar a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos de longitud completa: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos 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 a las diferentes clases de anticuerpos se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica.

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 términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada principal y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. 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), células de riñón de cría de hámster, 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 epitopo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más. En un modo de realización, un anticuerpo anti-BACE1 que forma uno de los anticuerpos biespecíficos o multispecíficos de la invención se une al epitopo de BACE1 unido por YW412.8.31. En el presente documento se proporciona un ensayo de competencia ejemplar.

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 provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radioactivos 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; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados en el presente documento.

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 lograr 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 porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana 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 o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos de aminoácido en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado 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.

El término "receptor FcRn" o "FcRn" como se usa en el presente documento se refiere a un receptor de Fc ("n" indica neonatal) que es conocido por estar implicado en la transferencia de IgG maternas a un feto a través de la placenta humana o de primate, o el saco vitelino (conejos) y a un neonato desde el calostro a través del intestino delgado. También es conocido que FcRn está implicado en el mantenimiento de niveles constantes de IgG en suero uniendo las moléculas de IgG y reciclandolas en el suero. "Región de unión a FcRn" o "región de unión al receptor FcRn" se refiere a esa porción de un anticuerpo que interactúa con el receptor FcRn. Determinadas modificaciones en la región de unión a FcRn de un anticuerpo incrementan la afinidad del anticuerpo o fragmento del mismo por el FcRn y también incrementan la semivida in vivo de la molécula. Las sustituciones de aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos 251, 256, 285, 290, 308, 314, 385, 389, 428, 434 y 436 incrementan la interacción del anticuerpo con el receptor FcRn. Las sustituciones en las siguientes posiciones también incrementan la interacción de un anticuerpo con el receptor FcRn 238, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución de (patente de EE. UU. nº 7.371.826).

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas incluyendo, pero sin limitarse, un marcador o un agente citotóxico. Opcionalmente, dicha conjugación es por medio de un conector.

Un "conector", como se usa en el presente documento, es una estructura que conecta covalentemente o no covalentemente el anticuerpo anti-TfR a una molécula heteróloga. En determinados modos de realización, un conector es un péptido. En otros modos de realización, un conector es un conector químico.

Un "marcador" es un marcador acoplado al anticuerpo en el 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 por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, RM), 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 a, animales domésticos (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 entorno natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, por procedimientos electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (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).

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

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-TfR" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyéndose dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

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 "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrada con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V40D digital. El programa ALIGN-2 establece todos los parámetros de comparación de secuencias y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos aminoácidos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el

presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal 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 le 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 variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a una intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo al que se está tratando, y que se puede realizar para profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación de la enfermedad y remisión o 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.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural, en general, tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt et al. Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno concreto se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan de forma funcional. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

A. Producción de anticuerpos anti-TfR y conjugados de los mismos

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en anticuerpos anti-TfR que se pueden usar para transportar moléculas deseadas a través de la BHE. En determinados modos de realización, se proporcionan anticuerpos que se unen a TfR humano. En determinados modos de realización, se proporcionan anticuerpos que se unen tanto a TfR humano como a TfR de primate. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades que afectan al cerebro y/o al SNC.

Anticuerpos anti-TfR ejemplares

En el presente documento se divulgan anticuerpos aislados que se unen a TfR. En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-TfR de la invención se une específicamente tanto a TfR humano como a TfR de primate. En determinados de dichos modos de realización, un anticuerpo anti-TfR de la invención no inhibe la unión de transferrina al TfR. En determinados aspectos, los anticuerpos anti-TfR se pueden usar para transportar uno o más compuestos terapéuticos o de formación de imágenes conjugados a través de la BHE.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-TfR de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un modo de realización, un anticuerpo anti-TfR es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-TfR de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones 1-7 a continuación:

A. Afinidad de anticuerpos

Un anticuerpo divulgado en el presente documento puede tener una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

Un anticuerpo anti-TfR de "baja afinidad" divulgado en el presente documento se selecciona en base, por ejemplo, a los resultados del ejemplo 5 y en Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3, 84ra43 (2011) y Yu et al., Sci. Transl. Med. 25 de mayo de 2011: vol. 3, número 84, pág. 84ra44, que muestra que dichos anticuerpos de menor afinidad contra TfR muestran una captación mejorada en el SNC (por ejemplo, el cerebro) y/o persistencia en el cerebro/SNC. Para identificar dichos anticuerpos de baja afinidad, están disponibles diversos ensayos para medir la afinidad de los anticuerpos, incluyendo, sin limitación: ensayo de Scatchard y técnica de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, usando BIACORE®). De acuerdo con un modo de realización de la invención, el anticuerpo tiene una afinidad por TfR humano o de primate de aproximadamente 5 nM , o de aproximadamente 20 nM , o de aproximadamente 100 nM , o aproximadamente $50 \mu\text{M}$, o a aproximadamente $30 \mu\text{M}$, o a aproximadamente $10 \mu\text{M}$, o a aproximadamente $1 \mu\text{M}$, o a aproximadamente 500 nM . Por tanto, la afinidad puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 nM a aproximadamente $50 \mu\text{M}$, o en el intervalo de aproximadamente 20 nM a aproximadamente $30 \mu\text{M}$, o en el intervalo de aproximadamente 30 nM a aproximadamente $30 \mu\text{M}$, o en el intervalo de aproximadamente 50 nM a aproximadamente $1 \mu\text{M}$, o en el intervalo de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM , por ejemplo, como se mide por análisis de Scatchard o BIACORE®. En otro modo de realización de la invención, el anticuerpo tiene una semivida de disociación de TfR de menos de 1 minuto, menos de 2 minutos, menos de 3 minutos, menos de cuatro minutos, menos de 5 minutos o menos de 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, o a aproximadamente 30 minutos, como se mide por análisis de unión de competición o BIACORE®.

Por tanto, en el presente documento se divulga un procedimiento de elaboración de un anticuerpo útil para transportar un fármaco para un trastorno neurológico a través de la barrera hematoencefálica que comprende seleccionar un anticuerpo de un panel de anticuerpos contra TfR porque tiene una afinidad por TfR que está en el intervalo de aproximadamente 5 nM , o de aproximadamente 20 nM , o de aproximadamente 100 nM , o aproximadamente $50 \mu\text{M}$, o a aproximadamente $30 \mu\text{M}$, o a aproximadamente $10 \mu\text{M}$, o a aproximadamente $1 \mu\text{M}$, o a aproximadamente 500 nM . Por tanto, la afinidad puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 nM a aproximadamente $50 \mu\text{M}$, o en el intervalo de aproximadamente 20 nM a aproximadamente $30 \mu\text{M}$, o en el intervalo de aproximadamente 30 nM a aproximadamente $30 \mu\text{M}$, o en el intervalo de aproximadamente 50 nM a aproximadamente $1 \mu\text{M}$, o en el intervalo de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM , por ejemplo, como se mide por análisis de Scatchard o BIACORE®. Como comprenderá un experto en la técnica, la conjugación de una molécula/compuesto heterólogo con un anticuerpo a menudo disminuirá la afinidad del anticuerpo por su diana debido, por ejemplo, al impedimento estérico o incluso a la eliminación de un brazo de unión si el anticuerpo se ha preparado multiespecífico con uno o más brazos de unión a un antígeno diferente a la diana original del anticuerpo. En un modo de realización, un anticuerpo de baja afinidad de la invención específico para TfR conjugado con anti-BACE1 tenía una K_d para TfR como se mide por BIACORE de aproximadamente 30 nM . En otro modo de realización, un anticuerpo de baja afinidad de la invención específico para TfR conjugado con BACE1 tenía una K_d para TfR como se mide por BIACORE de aproximadamente 600 nM . En otro modo de realización, un anticuerpo de baja afinidad de la invención específico para TfR conjugado con BACE1 tenía una K_d para TfR como se mide por BIACORE de aproximadamente $20 \mu\text{M}$. En otro modo de realización, un anticuerpo de baja afinidad de la invención específico para TfR conjugado con BACE1 tenía una K_d para TfR como se mide por BIACORE de aproximadamente $30 \mu\text{M}$.

En un modo de realización, K_d se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En un modo de realización, se realiza un RIA con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (125I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando, a continuación, el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con $5 \mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM ($\text{pH } 9,6$) y posteriormente se bloquean con soroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc, n.º 269620), se mezcla [125I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consecuentemente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se retira la solución y se lava la placa ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden $150 \mu\text{l/pocillo}$ de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y se cuentan las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que den menos de o igual a un 20% de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

En un aspecto, el RIA es un análisis de Scatchard. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TfR de interés se puede yodar usando el procedimiento de lactoperoxidasa (Bennett y Horuk, *Methods in Enzymology* 288 páginas 134-148 (1997)). Un anticuerpo anti-TfR radiomarcado se purifica de ^{125}I -Na libre por filtración en gel usando una columna aNAP-5 y se mide su actividad específica. Las mezclas de reacción de competición de 50 μl que contienen una concentración fija de anticuerpo yodado y concentraciones decrecientes de anticuerpo no marcado diluido en serie se colocan en placas de 96 pocillos. Las células que expresan transitoriamente TfR se cultivan en medios de crecimiento, que consisten en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Genentech) complementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM y 1 x penicilina-estreptomicina a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se desprenden las células de las placas usando solución de disociación Sigma Cell y se lavan con tampón de unión (DMEM con seroalbúmina bovina al 1 %, HEPES 50 mM, pH7,2 y azida sódica al 0,2 %). Se añaden las células lavadas a una densidad aproximada de 200 000 células en 0,2 ml de tampón de unión a las placas de 96 pocillos que contenían las mezclas de reacción de competencia de 50 μl . La concentración final del anticuerpo no marcado en la reacción de competición con células se varía, empezando en 1000 nM y disminuyendo, a continuación, en un factor de dilución 1:2 para 10 concentraciones e incluyendo una muestra de tampón solo sin nada añadido. Las reacciones de competición con células para cada concentración de anticuerpo no marcado se someten a ensayo por triplicado. Las reacciones de competición con células se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de las 2 horas de incubación, las reacciones de competición se transfieren a una placa de filtro y se lavan cuatro veces con tampón de unión para separar el anticuerpo libre del anticuerpo yodado unido. Los filtros se cuentan con un contador gamma y los datos de unión se evalúan usando el algoritmo de ajuste de Munson y Rodbard (1980) para determinar la afinidad de unión del anticuerpo.

Un análisis de BIACORE® ejemplar que usa las composiciones de la invención se puede realizar como sigue. La K_d se midió usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C usando el kit de anti-Fc humano (BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Brevemente, se activaron chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El anticuerpo anti-Fc humano se diluyó con acetato de sodio 10 mM, pH 4,0, a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antes de la inyección a un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ para lograr aproximadamente 10 000 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del anticuerpo, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no habían reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectaron variantes de anticuerpo anti-TfR mono-específicas o multi-específicas en HBS-P hasta alcanzar aproximadamente 220 UR; a continuación, se inyectaron diluciones en serie 1:2 de MuTfR-His (0,61 nM a 157 nM) en HBS-P a 25 °C a un caudal de aproximadamente 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se calcularon las tasas de asociación (kas) y las tasas de disociación (kdis) usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIACORE® versión 3.2) por ajuste de forma simultánea de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calculó como la proporción kdis/kas. Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999).

De acuerdo con otro modo de realización, la K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial con un dispositivo BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C usando el kit de anti-Fc humano (BIAcore Inc., Piscataway, NJ). En resumen, se activan chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El anticuerpo anti-Fc humano se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,0, a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antes de la inyección a un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ para conseguir aproximadamente 10 000 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del anticuerpo, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan variantes de anticuerpo anti-TfR en HBS-P hasta alcanzar aproximadamente 220 UR; a continuación, se inyectan diluciones en serie 1:2 de MuTfR-His (0,61 nM a 157 nM) en HBS-P a 25 °C a un caudal de aproximadamente 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se calculan las tasas de asociación (kas) y las tasas de disociación (kdis) usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIACORE® versión 3.2) por ajuste de forma simultánea de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la proporción kdis/kas. Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999).

Diversos procedimientos de determinación de la CI50 para un compuesto dado son conocidos en la técnica; un abordaje común es realizar un ensayo de unión por competencia, tal como el que se describe en el presente documento. En general, una CI50 alta indica que se requiere más del anticuerpo para inhibir la unión del ligando conocido y, por tanto, que la afinidad del anticuerpo por ese ligando es relativamente baja. Por el contrario, una CI50 baja indica que se requiere menos del anticuerpo para inhibir la unión del ligando conocido y, por tanto, que la afinidad del anticuerpo por ese ligando es relativamente alta.

Un ensayo ELISA competitivo ejemplar para medir la CI50 es uno en el que se usan concentraciones crecientes de anticuerpos variantes anti-TfR o anti-TfR/antígeno cerebral (es decir, anti-TfR/BACE1, anti-TfR/Abeta y similares) para competir contra un anticuerpo anti-TfRA conocido biotinilado por la unión a TfR. El ELISA de competición anti-TfR se realizó en placas Maxisorp (Neptuno, N.J.) recubiertas con 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dominio extracelular de TfR murino purificado en PBS a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron con Tween 20 al

0,05 % en PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Una valoración de cada anti-TfR o anti-TfR/antígeno cerebral individual (es decir, anti-TfR/BACE1 o anti-TfR/Abeta) (dilución en serie 1:3) se combinó con anti-TfR conocido biotinilado (concentración final 0,5 nM) y se añadió a la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se añadió HRP-estreptavidina (Southern Biotech, Birmingham) a la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 %, y se detectó el anticuerpo anti-TfR biotinilado unido a la placa usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

B. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pp. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítipo de unión a receptor de rescate y que tienen una semivida in vivo incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, E. coli o fago), como se describe en el presente documento.

C. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567 y en Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. 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). En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, mientras se retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de elaboración de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) y se describen además, por ejemplo, en Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (que describen el injerto de una región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (que describen el "barajado de FR"); y Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) y Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véanse, por ejemplo, Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); y Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véanse, por ejemplo, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

D. Anticuerpos humanos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen, en general, anticuerpos humanos en van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) y Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica. Dichos animales típicamente contienen todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos se han inactivado, en general, los locus de inmunoglobulina endógena. Para una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429, que describe la tecnología HuMab®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar además, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos por procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véanse, por ejemplo, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas de células de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, Histology y Histopathology, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3): 185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humano. A continuación, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

E. Anticuerpos derivados de colecciones

Se pueden aislar los anticuerpos de la invención cribando colecciones combinatorias para determinar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para detectar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004).

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que, a continuación, se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter et

al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Los fagos típicamente presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad con respecto al inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando segmentos de genes V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contengan secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y lograr el reordenamiento in vitro, como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos con anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

F. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es por TfR y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de TfR. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan TfR. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para elaborar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan diferentes especificidades (véanse Milstein y Cuello, Nature 305: 537 (1983), el documento WO 93/08829 y Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)), y genomanipulación por "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para elaborar moléculas heterodiméricas con Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)); usando tecnología de "diacuerpos" para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:64446448 (1993)); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a TfR, así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

De acuerdo con un modo de realización de la invención, el "acoplamiento" se logra generando un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico). Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos o epítopos diferentes. En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al TfR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral, tal como beta-secretasa 1 (BACE1) o Abeta, y los otros antígenos cerebrales divulgados en el presente documento.

Un antígeno cerebral ejemplar unido por dicho anticuerpo multiespecífico/biespecífico es BACE1, y un anticuerpo ejemplar de unión al mismo es el anticuerpo YW412.8.31 en las FIGS 16A-B en el presente documento.

En otro modo de realización, el antígeno cerebral es Abeta, se describen dichos anticuerpos ejemplares en los documentos WO2007068412, WO2008011348, WO20080156622 y WO2008156621, comprendiendo un anticuerpo ejemplar contra Abeta el anticuerpo IgG4 MABT5102A que comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera en las FIGS. 11A y 11B, respectivamente.

Las técnicas para elaborar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan diferentes especificidades (véanse Milstein y Cuello, Nature 305: 537 (1983), el documento WO 93/08829 y Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)), y genomanipulación por "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden elaborar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para

preparar moléculas heterodiméricas con Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan et al., Science, 229: 81 [1985]); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny et al., J. Immunol., 148[5]: 1547-1553 [1992]); usando tecnología de "diacuerpos" para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 [1993]); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 [1994]); y elaborando anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

Los anticuerpos modificados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo "anticuerpos pulpo" o "inmunoglobulinas de dominio de dos variables" (DVD) también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US2006/0025576A1 y Wu et al. Nature Biotechnology (2007)).

G. Variantes de anticuerpo

En determinados modos de realización se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede preparar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a. Variantes de sustitución, inserción y deleción

En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones aminoacídicas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla 2 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 2 bajo el encabezado de "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadena lateral aminoacídica. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos por una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

TABLA 2

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para otro estudio tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo con afinidad madurada, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban por una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Se pueden preparar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de HVR, es decir, residuos codificados por codones que experimentan una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o residuos que se ponen en contacto con el antígeno, sometándose a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. La maduración de la afinidad construyendo y volviendo a seleccionar colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ (2001)). En algunos modos de realización de maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para su maduración por cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, barajado de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una colección secundaria. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando mutagénesis o modelado por barrido de alanina. A menudo se seleccionan, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden preparar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar, por ejemplo, fuera de los residuos en contacto con el antígeno en las HVR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones aminoácidas.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar como diana para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento se identifican un residuo o grupo de residuos diana

(por ejemplo, residuos con carga, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar o eliminar como candidatos para sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminal que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

b. Variantes de glucosilación

En determinados modos de realización se altera un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o delección de sitios de glucosilación en un anticuerpo se puede lograr convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o se retiren uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato fijado a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que se fija en general por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa fijada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura oligosacárida biantenaria. En algunos modos de realización se pueden preparar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa fijada (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras fijadas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "carente de fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO carentes de fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L.; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con genes inactivados, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO con genes inactivados (véanse, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

Se proporcionan además variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico fijado a la región Fc del anticuerpo se biseca por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o una función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana et al.); y el documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización, se pueden introducir una o más modificaciones aminoacídicas en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando, de este modo, una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que le convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo in vivo es importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (de ahí que probablemente carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan Fc(γ)RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(γ)RI, Fc(γ)RII y Fc(γ)RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos in vitro para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar in vivo la actividad de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y de ahí que carezca de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). La unión a FcRn y determinaciones del aclaramiento/semivida in vivo también se pueden realizar usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006)).

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con una unión a FcR mejorada o disminuida. (Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).)

En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En algunos modos de realización, las alteraciones se realizan en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

En el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.) se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc, no limitantes, incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

Véanse también Duncan y Winter, Nature 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d. Variantes de anticuerpo genomanipulado con cisteína

En determinados modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan, de este modo, en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe además en el presente documento. En determinados modos de realización, se puede sustituir con cisteína uno cualquiera o más de los siguientes residuos: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc con las cadenas pesadas. Se pueden generar anticuerpos genomanipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

e. Derivados de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar además para que contenga restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar y, si se fija más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, se puede determinar el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se van a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar selectivamente por exposición a radiación. En un modo de realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan células normales, pero que calientan el resto no proteínico hasta una temperatura a la que las células próximas al anticuerpo-resto no proteínico se destruyen.

B. Composiciones y procedimientos recombinantes

Se pueden producir anticuerpos usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-TfR descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otro modo de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfática (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de elaboración de un anticuerpo anti-TfR, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-TfR, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos

en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, se puede aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de donación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con vías de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véanse Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar conjuntamente con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adapten al cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR- (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-TfR proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar por o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

Están disponibles diversas técnicas para determinar la unión del anticuerpo al TfR. Uno de dichos ensayos es un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para confirmar la capacidad de unirse a TfR humano (y antígeno cerebral). De acuerdo con este ensayo, las placas recubiertas con antígeno (por ejemplo, TfR recombinante) se incuban con una muestra que comprende el anticuerpo anti-TfR y se determina la unión del anticuerpo al antígeno de interés.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, por procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunoelectrotransferencia, etc.

En otro aspecto, se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos de la invención por la unión a TfR. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competitivo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) que está unido por cualquiera de los anticuerpos de la invención, más específicamente, cualquiera de los epítipos unidos específicamente por anticuerpos de clase I, clase II, clase III o clase IV como se describe en el presente documento (véase, por ejemplo, el ejemplo 1 y la tabla 4. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ensayo de competencia ejemplar, se incubaba TfR inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a TfR (por ejemplo, uno o más de los anticuerpos divulgados en el presente documento) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad de

competir con el primer anticuerpo por la unión a TfR. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control se incubó TfR inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones propicias para la unión del primer anticuerpo a TfR, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado con TfR inmovilizado. Si se reduce sustancialmente la cantidad de marcador asociado con TfR inmovilizado en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión a TfR. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-TfR de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, transportar un compuesto asociado/conjugado con el anticuerpo a través de la BHE al cerebro y/o el SNC. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica in vivo y/o in vitro.

En determinados modos de realización se somete a prueba un anticuerpo de la invención para determinar dicha actividad biológica.

D. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-TfR en el presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o isótopos radioactivos.

La conjugación covalente puede ser directa o bien 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 el anticuerpo anti-TfR y, por ejemplo, el fármaco para trastornos neurológicos y su expresión 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 porciones del anticuerpo anti-TfR y un grupo correspondiente o aceptador en él, por ejemplo, fármaco neurológico. 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 el anticuerpo anti-TfR y formar un enlace disulfuro con él, por ejemplo, fármaco neurológico. Los procedimientos para la conjugación covalente de los ácidos nucleicos a proteínas también son conocidos en la técnica (es decir, fotoreticulación, véase, por ejemplo, Zatz et al. *Russ. Chem. Rev.* 74: 77-95 (2005)).

La conjugación no covalente puede ser por cualquier medio de unión no covalente, incluyendo enlaces hidrófobos, enlaces iónicos, interacciones electrostáticas y similares, como comprenderá fácilmente un experto en la técnica.

La conjugación también se puede realizar usando una variedad de conectores. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TfR y un fármaco neurológico se pueden conjugar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridiliditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzilo)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzilo)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. 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 del fármaco neurológico después de la administración al cerebro. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

La invención del presente documento contempla expresamente, pero no se limita a, conjugados preparados con reactivos reticulantes, incluyendo, pero sin limitarse a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-

SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo se conjuga a uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitarse a, un maitansinoide (véanse las patentes de EE. UU. N.º 5.208.020, 5.416.064, y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o derivado de la misma (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman et al. *Cancer Res.* 53:3336-3342, (1993); y Lode et al. *Cancer Res.* 58:2925-2928, (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véanse Kratz et al. *Current Med. Chem.* 13:477-523, (2006); Jeffrey et al. *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362, (2006); Torgov et al. *Bioconj. Chem.* 16:717-721, (2005); Nagy et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834, (2000); Dubowchik et al. *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532, (2002); King et al. *J. Med. Chem.* 45:4336-4343, (2002); y la patente de EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radioactivos están disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o un marcador de espín para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, RM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

E. Composiciones y procedimientos para diagnóstico y detección

En determinados modos de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-TfR divulgados en el presente documento es útil para detectar la presencia de TfR en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como sangre (es decir, glóbulos rojos inmaduros), LCR y tejido que contiene BHE.

En un modo de realización se proporciona un anticuerpo anti-TfR para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto se proporciona un procedimiento de detección de la presencia de TfR en una muestra biológica. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-TfR como se describe en el presente documento en condiciones propicias para la unión del anticuerpo anti-TfR a TfR, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-TfR y TfR. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento in vitro o in vivo. En un modo de realización se usa un anticuerpo anti-TfR para seleccionar sujetos idóneos para su tratamiento con un anticuerpo anti-TfR, por ejemplo, donde TfR es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de la invención incluyen trastornos que implican glóbulos rojos inmaduros, debido al hecho de que el TfR se expresa en reticulocitos y, por lo tanto, es detectable por cualquiera de los anticuerpos de la invención. Dichos trastornos incluyen anemia y otros trastornos que surgen de niveles reducidos de reticulocitos, o policitemia congénita o policitemia vera neoplásica, donde los recuentos elevados de glóbulos rojos debido a la hiperproliferación de, por ejemplo, reticulocitos, dan como resultado un espesamiento de la sangre y síntomas fisiológicos concomitantes.

En determinados modos de realización se proporcionan anticuerpos anti-TfR marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodenso, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H y ¹³¹I, fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato

deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

En un modo de realización, el anticuerpo intacto carece de función efectora. En otro modo de realización, el anticuerpo intacto tiene una función efectora reducida. En otro modo de realización, el anticuerpo intacto se genomanipula para que tenga una función efectora reducida. En un aspecto, el anticuerpo es un Fab. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una o más mutaciones de Fc que reducen o eliminan la función efectora. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una glucosilación modificada debido, por ejemplo, a que el anticuerpo se produce en un sistema que carece de enzimas de glucosilación humanas normales. En otro aspecto, la cadena principal de Ig se modifica a una que posee naturalmente una función efectora limitada o nula.

Están disponibles diversas técnicas para determinar la unión del anticuerpo al TfR. Uno de dichos ensayos es un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para confirmar la capacidad de unirse a TfR humano (y antígeno cerebral). De acuerdo con este ensayo, las placas recubiertas con antígeno (por ejemplo, TfR recombinante) se incuban con una muestra que comprende el anticuerpo anti-TfR y se determina la unión del anticuerpo al antígeno de interés.

Los ensayos para evaluar la captación del anticuerpo administrado sistémicamente y otra actividad biológica del anticuerpo se pueden realizar como se divulga en los ejemplos o como es conocido para el anticuerpo anti-antígeno cerebral de interés.

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-TfR conjugados (covalente o bien no covalentemente) con anticuerpos anti-BACE1 que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la inhibición de la actividad aspartil-proteasa de BACE1. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica in vivo y/o in vitro, por ejemplo, como se evalúa por el ensayo de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) o un ensayo de electroforesis capilar de microfluidos (MCE) usando péptidos sintéticos de sustrato, o in vivo en líneas celulares que expresan sustratos de BACE1 tales como APP.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-TfR como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: 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 metil o propilparabeno; catecol; 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 carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión intersticial de fármacos tales como glucoproteínas hialuronidasas activas a pH neutro solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas hialuronidasas PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinadas sHA-SEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y el documento WO 2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón acetato-histidina.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además uno o más ingredientes activos para tratar un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno por enfermedad ocular, un trastorno convulsivo, una enfermedad de almacenamiento lisosómico, una amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno del comportamiento o inflamación del SNC. A continuación en el presente documento, se analizan dichos medicamentos ejemplares. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, ed. Osol, A. (1980). Uno o más ingredientes activos se pueden encapsular en liposomas que están acoplados a anticuerpos anti-TfR descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20020025313).

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 no limitantes de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metakrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico).

Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo son en general estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Composiciones y procedimientos terapéuticos

Se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-TfR proporcionados en el presente documento en procedimientos terapéuticos. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TfR para su uso como medicamento. Por ejemplo, la invención proporciona un procedimiento de transporte de un compuesto terapéutico a través de la barrera hematoencefálica con impacto reducido o eliminado sobre poblaciones de glóbulos rojos que comprende exponer el anticuerpo anti-TfR acoplado a un compuesto terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que se une tanto al TfR como a un antígeno cerebral) a la BHE, de modo que el anticuerpo transporta el compuesto terapéutico acoplado al mismo a través de la BHE. En otro ejemplo, la invención proporciona un procedimiento de transporte de un fármaco para trastornos neurológicos a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer un anticuerpo anti-TfR de la invención acoplado a un fármaco para trastornos cerebrales (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que se une tanto al TfR como a un antígeno cerebral) a la BHE de modo que el anticuerpo transporta el fármaco para trastornos neurológicos acoplado al mismo a través de la BHE con impacto reducido o eliminado sobre poblaciones de glóbulos rojos. En un modo de realización, la BHE es de un mamífero (por ejemplo, un ser humano), por ejemplo, uno que tenga 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.

En un modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona de: una neuropatía, una amiloidosis, un cáncer (por ejemplo, que implica al SNC o cerebro), una enfermedad o trastorno ocular, una infección vírica o microbiana, inflamación (por ejemplo, del SNC o cerebro), isquemia, enfermedad neurodegenerativa, convulsiones, trastorno del comportamiento, enfermedad de almacenamiento lisosómico, etc. Los anticuerpos de la invención son, en particular, adecuados para el tratamiento de dichos trastornos neurológicos debido a su capacidad de transportar uno o más ingredientes activos asociados/compuestos terapéuticos acoplados a través de la BHE y al SNC/cerebro, donde dichos trastornos encuentran su base molecular, celular o vírica/microbiana.

Los trastornos neuropáticos son enfermedades o anomalías del sistema nervioso que están caracterizados por una señalización nerviosa inapropiada o incontrolada o carencia de la misma, e incluyen, pero no se limitan a, dolor crónico (incluyendo dolor nocisensible), dolor provocado por una lesión en los tejidos corporales, incluyendo dolor relacionado con cáncer, dolor neuropático (dolor provocado por anomalías en los nervios, médula espinal o cerebro) y dolor psicógeno (total o principalmente 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.

Para un trastorno neuropático, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un analgésico, incluyendo, pero sin limitarse a, un analgésico opiáceo/opioides (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, carbamacepina, clonazepam, gabapentina, lamotrigina, pregabalina, tiagabina y topiramato), un anestésico (es

decir, isoflurano, tricloroetileno, halotano, sevoflurano, benzocaína, cloroprocaina, cocaína, ciclometacaína, dimetocaína, propoxicaína, procaina, novocaína, proparacaina, tetracaina, 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 sea un agente antivertiginoso, incluyendo, pero sin limitarse a, meclizina, difenhidramina, prometazina y diazepam. Para un trastorno neuropático con afectación por náuseas, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un agente antiemético, incluyendo, pero sin limitarse a, prometazina, clorpromazina, proclorperazina, trimetobenzamida y metoclopramida.

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con los depósitos proteínicos extracelulares en el SNC, incluyendo, pero sin limitarse 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 (de tipo holandés); el complejo de Parkinson-demencia de Guam, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiiforme transmisible, demencia relacionada con VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis con cuerpos de inclusión (MCI) y enfermedades oculares relacionadas con el depósito de amiloide beta (es decir, degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusas y cataratas).

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 sin limitarse a, una molécula pequeña, un péptido, un aptámero u otro aglutinante a proteína) que se une específicamente a una diana seleccionada de: beta-secretasa, tau, presenilina, proteína precursora de amiloide o porciones de la misma, péptido amiloide beta 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, benztatropina, 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 sin limitarse 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.

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, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, astrocitoma, neuroma acústico, condroma, oligodendroglioma, meduloblastomas, ganglioglioma, schwannoma, neurofibroma, neuroblastoma y tumores extradural, intramedular o intradural.

Para el cáncer, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea 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, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colquicinas; 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; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, clormetina, clorhidrato de óxido de clormetina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enodinos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma II y calicheamicina omega II (véase, por ejemplo, Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33 (1994) 183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enodinos de cromoproteínas relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolinodoxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como

fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-25-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales, tales como aminogluteína, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet, pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbacin; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbacin; manomustina; mitobronitol; mitolactol; 5-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 ABRAXANETM (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloramucilo; 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 la 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, una abreviatura para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona, y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) 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 del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores por disminución del receptor de estrógenos (ERD); agentes que funcionan para suprimir o apagar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprorelina LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminogluteína, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIL®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterápicos incluye bifosfonatos 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 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 (EGFR); 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 de molécula pequeña de tirosina cinasa doble 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 prevención del cáncer son inmunoglobulinas antineoplásicas (incluyendo, pero sin limitarse a, trastuzumab, pertuzumab, bevacizumab, alemtuzumab, cetuximab, gemtuzumab ozogamicin, ibritumomab tiuxetan, panitumumab y rituximab). En algunos casos, se pueden usar anticuerpos junto con un marcador o conjugado tóxico para seleccionar como diana y destruir células deseadas (es decir, células cancerosas), incluyendo, pero sin limitarse a, tositumomab con un radiomarcador de 131I o trastuzumab emtansina.

Las enfermedades o trastornos oculares son enfermedades o trastornos del ojo, que, para los propósitos en el presente documento, se considera un órgano del SNC segregado por la BHE. Las enfermedades o trastornos oculares incluyen, pero no se limitan a, trastornos de la esclerótica, córnea, iris y cuerpo ciliar (es decir, escleritis, queratitis, úlcera corneal, abrasión corneal, nifablepsia, ojo de arco, queratitis puntiforme superficial de Thygeson, neovascularización corneal, distrofia de Fuchs, queratocono, queratoconjuntivitis seca, iritis y uveítis), trastornos del cristalino (es decir, cataratas), trastornos de la coroides y retina (es decir, desprendimiento de retina, retinosquiasis, retinopatía hipertensiva, retinopatía diabética, retinopatía, retinopatía del prematuro, degeneración macular senil, degeneración macular (húmeda o seca), membrana epirretiniana, retinitis pigmentosa y edema macular), glaucoma, moscas volantes, trastornos del nervio óptico y vías visuales (es decir, neuropatía óptica hereditaria de Leber y drusas del disco óptico), trastornos de los músculos oculares/movimiento binocular/acomodación/refracción (es decir, estrabismo, oftalmoparesia, oftalmoplejia externa progresiva,

estrabismo convergente, estrabismo divergente, hipermetropía, miopía, astigmatismo, anisometropía, presbicia y oftalmoplejia), trastornos visuales y ceguera (es decir, ambliopía, amaurosis congénita de Lever, escotoma, daltonismo, acromatopsia, ambliopía nocturna, ceguera, oncocercosis y microftalmia/coloboma), conjuntivitis, signo de Argyll Robertson, queratomycosis, xeroftalmia y aniridia.

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 para 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 antihistaminico oftálmico (es decir, nafazolina, fenilefrina y tetrahidrozolina), un lubricante ocular, un esteroide oftálmico (es decir, fluorometolona, prednisolona, loteprednol, dexametasona, difluprednato, rimexolona, fluocinolona, medrisolona y triamcinolona), un anestésico oftálmico (es decir lidocaína, proparacaina y tetracaina), un antiinfeccioso oftálmico (es decir, levofloxacino, gatifloxacino, 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 antihistaminico o descongestivo oftálmico (es decir, ketotifeno, olopatadina, epinastina, nafazolina, cromolina, tetrahidrozolina, pemirolast, bepotastina, nafazolina, fenilefrina, nedocromilo, lodoxamida, fenilefrina, emedastina y azelastina).

Las infecciones víricas o microbianas del SNC incluyen, pero no se limitan a, infecciones por virus (es decir, gripe, VIH, virus de la poliomielitis, 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 sin limitarse a, meningitis, encefalitis, mielitis, vasculitis y absceso, que pueden ser agudas o crónicas.

Para una enfermedad vírica o microbiana, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluya, pero no se limite a, un compuesto antivírico (incluyendo, pero sin limitarse a, un antivírico de adamantano (es decir, rimantadina y amantadina), un interferón antivírico (es decir, peg-interferón alfa-2b), un antagonista del receptor de quimiocina (es decir, maraviroc), un inhibidor de la transferencia de la cadena 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, fosamprenavir, tipranavir, ritonavir, nelfinavir, 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 fomivirsen)), un antibiótico (incluyendo, pero sin limitarse a, aminopenicilina (es decir, amoxicilina, ampicilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucoxacilina, temocilina, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina y bacampicilina), una cefalosporina (es decir, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefamandol, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, 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, nocardicina A y tabtoxinina betalactámica), 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, estreptomycin, tobramicina y paromomicina), una ansamicina (es decir, geldanamycin y herbimicina), un carbacefem (es decir, loracarbef), un glucopéptido (es decir, teicoplanina y vancomicina), un macrólido (es decir, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espectinomycin), 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, sulfisoxazol, 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, dactinomycin, 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, tinidazol, cloroquina, yodoquinol y paromomicina) y un antiparasitario (incluyendo, pero sin limitarse a, quinina, cloroquina, amodiaquina, pirimetamina, sulfadoxina, proguanil, mefloquina, atovaquona, primaquina, artesunina, halofantrina, doxiciclina, clindamicina, mebendazol, pamoato de pirantel, tiabendazol, dietilcarbamazina, ivermectina, rifampina, anfotericina B, melarsoprol, efonitina y albendazol).

La inflamación del SNC incluye, pero no se limita a, inflamación que está provocada por una lesión en el SNC, que puede ser una lesión física (es decir, debido a un accidente, cirugía, traumatismo cerebral, lesión de la médula espinal, conmoción cerebral) y una lesión debida o relacionada con una o más de otras enfermedades o trastornos

del SNC (es decir, absceso, cáncer, infección vírica o microbiana).

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

La isquemia del SNC, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de trastornos relacionados con una circulación sanguínea o comportamiento vascular anómalo en el cerebro o a las causas de los mismos, e incluye, pero no se limita a: isquemia cerebral focal, isquemia cerebral global, apoplejía (es decir, hemorragia subaracnoidea y hemorragia intracerebral) y aneurisma.

Para la isquemia, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluya, pero no se limite a, un trombolítico (es decir, urocinasa, alteplasa, reteplasa y tenecteplasa), un inhibidor de la agregación plaquetaria (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 la circulación sanguínea o la flexibilidad vascular, incluyendo, por ejemplo, antihipertensores.

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la pérdida de función o muerte de las células neurales 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 provocada por o asociada con una amiloidosis, ataxia de Friedreich, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Kennedy, atrofia multisistémica, esclerosis múltiple, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, atrofia muscular espinal, mielitis transversa, enfermedad de Refsum y ataxia espinocerebelosa.

Para una enfermedad neurodegenerativa, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea una hormona del crecimiento o factor neurótrofo; los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el factor neurótrofo 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 y transformación (TGF)-alfa, TGF-beta, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra), factor neurótrofo ciliar (CNTF), factor neurótrofo derivado de la neuroglia (GDNF), neurturina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, neuregulina, artemina, persefina, interleucinas, factor neurótrofo derivado de la línea de neuroglia (GFR), factor estimulante de colonias de granulocitos (CSF), CSF de granulocitos-macrófagos, netrinas, cardiotrofina-1, hedgehogs, factor inhibidor de la leucemia (LIF), midkina, pleiotrofina, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), netrinas, saposinas, semaforinas y factor de células madre (SCF).

Las enfermedades y trastornos convulsivos 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, crisis atónicas, epilepsia rolándica benigna, ausencia infantil, 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 tónico-clónicas, convulsiones tónicas, convulsiones psicomotoras, epilepsia límbica, convulsiones de inicio parcial, convulsiones de inicio generalizado, estado epiléptico, epilepsia abdominal, convulsiones acinéticas, convulsiones autónomas, mioclonía bilateral masiva, epilepsia catamenial, crisis atónicas, convulsiones emocionales, convulsiones focales, convulsiones gelásticas, progresión jacksoniana, enfermedad de Lafora, convulsiones motoras, convulsiones multifocales, convulsiones nocturnas, convulsiones fotosensibles, pseudoconvulsiones, convulsiones sensoriales, convulsiones leves, convulsiones de Sylvan, convulsiones por abstinencia y convulsiones reflejas visuales).

Para un trastorno convulsivo, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un anticonvulsivo o antiepiléptico, incluyendo, pero sin limitarse a, anticonvulsivos barbitúricos (es decir, primidona, metarbital, mefobarbital, alobarbital, amobarbital, aprobarbital, alfenal, barbital, bralobarbital y fenobarbital), anticonvulsivos benzodiacepínicos (es decir, diazepam, clonazepam y lorazepam), anticonvulsivos de carbamato (es decir, felbamato), anticonvulsivos inhibidores de la anhidrasa carbónica (es decir, acetazolamida, topiramato y zonisamida), anticonvulsivos dibenzacepínicos (es decir, rufinamida, carbamazepina y oxcarbazepina), anticonvulsivos derivados de ácidos grasos (es decir, divalproex y ácido valproico), análogos de ácido gamma-aminobutírico (es decir, pregabalina, gabapentina y vigabatrina), inhibidores de la recaptación de ácido gamma-aminobutírico (es decir, tiagabina), inhibidores de la ácido gamma-aminobutírico transaminasa (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 oxazolidinona (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).

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

Para un trastorno del comportamiento, se puede seleccionar un fármaco neurológico de un compuesto modificador del comportamiento incluyendo, pero sin limitarse a, un antipsicótico atípico (es decir, risperidona, olanzapina, aripiprazol, 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 monoaminooxidasa (es decir, isocarboxazida, fenelzina, selegilina y tranilcipromina), una benzodiacepina (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, anfetamina, metilfenidato, dexmetilfenidato, lisdexanfetamina, modafinilo, pemolina, fendimetrazina, benzofetamina, fendimetrazina, armodafinilo, dietilpropión, cafeína, atomoxetina, doxapram y mazindol), un ansiolítico/sedante/hipnótico (incluyendo, pero sin limitarse a, un barbitúrico (es decir, secobarbital, fenobarbital y mefobarbital), una benzodiacepina (como se describe anteriormente) y un ansiolítico/sedante/hipnótico variado (es decir, difenhidramina, oxibato de sodio, zaleplón, hidroxizina, 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)).

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son trastornos metabólicos que, en algunos casos, están asociados con el 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), glucogenosis, gangliosidosis GM1, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Farber, leucodistrofia de Canavan y lipofuscinosis ceroides neuronal, tipos 1 y 2, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Pompe y enfermedad de Krabbe.

Para una enfermedad de almacenamiento lisosómico, se puede seleccionar un fármaco neurológico que por sí mismo o de otro modo imite a 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-acetil-galactosamina-6-sulfatasa, beta-galactosidasa, arilsulfatasa B, beta-glucuronidasa, ácido alfa-glucosidasa, glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida, beta-galactocerebrosidasa, beta-galactosidasa, arilsulfatasa A, ceramidasa ácida, aspartoacilasa, palmitoil-proteína tioesterasa 1 y tripeptidil amino peptidasa 1).

En otro modo de realización, las enfermedades relacionadas o provocadas por una sobreproducción inapropiada de glóbulos rojos, o en las que la sobreproducción de glóbulos rojos es un efecto de la enfermedad, se pueden prevenir o tratar por el efecto de disminución de reticulocitos reconocido en el presente documento de los anticuerpos anti-TfR que retienen al menos una función efectora parcial. Por ejemplo, en la policitemia vera congénita o neoplásica, los recuentos elevados de glóbulos rojos debido a la hiperproliferación de, por ejemplo, reticulocitos, dan como resultado un espesamiento de la sangre y síntomas fisiológicos concomitantes (d'Onofrio et al., *Clin. Lab. Haematol.* (1996) Suppl. 1: 29-34). La administración de un anticuerpo anti-TfR de la invención en el que se conserva al menos función efectora parcial del anticuerpo permitiría la retirada selectiva de poblaciones de reticulocitos inmaduros sin afectar al transporte normal de transferrina al SNC. La dosificación de dicho anticuerpo se podría modular de modo que los síntomas clínicos agudos se pudieran minimizar (es decir, dosificando a una dosis muy baja o a intervalos ampliamente espaciados), como se entiende bien en la técnica.

En un aspecto, se usa un anticuerpo divulgado en el presente documento para detectar un trastorno neurológico antes del inicio de los síntomas y/o para evaluar la gravedad o duración de la enfermedad o trastorno. En un aspecto, el anticuerpo permite la detección y/o formación de imágenes del trastorno neurológico, incluyendo la formación de imágenes por radiografía, tomografía o resonancia magnética nuclear (RMN).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad de la invención para su uso como medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) sin disminuir los glóbulos rojos (es decir, reticulocitos). En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad modificado para su uso en un procedimiento de tratamiento como se describe en el presente documento. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad modificado para mejorar su seguridad para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TfR (opcionalmente acoplado a un fármaco para trastornos neurológicos). En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TfR modificado para mejorar su seguridad para su uso en la reducción o inhibición de la formación de placa de amiloide en un paciente en riesgo o que padece una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es opcionalmente un ser humano. En determinados aspectos, el anticuerpo anti-TfR de la invención para su uso en los procedimientos de la invención mejora la captación del fármaco para trastornos neurológicos con el que está acoplado.

Los anticuerpos anti-TfR de la invención se pueden usar solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TfR 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 el mismo trastorno neurológico o uno diferente que el anticuerpo anti-TfR que se emplea para el tratamiento. 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 amiloide beta, antioxidantes, moduladores de γ -secretasa, miméticos del factor de crecimiento nervioso (NGF) o tratamiento génico con NGF, agonistas de PPAR γ , inhibidores de la HMS-CoA reductasa (estatinas), ampakinas, bloqueadores de los canales de calcio, antagonistas del receptor de GABA, inhibidores de la glucógeno sintasa cinasa, inmunoglobulina intravenosa, agonistas del receptor muscarínico, moduladores del receptor nicotínico, inmunización activa o pasiva frente al péptido amiloide beta, inhibidores de la fosfodiesterasa, antagonistas del receptor de serotonina y anticuerpos antipéptido amiloide beta. En determinados modos de realización, el al menos un agente terapéutico adicional se selecciona por su capacidad de mitigar uno o más efectos secundarios del fármaco neurológico.

Como se ejemplifica en el presente documento, determinados anticuerpos anti-TfR pueden tener efectos secundarios que impactan negativamente en las poblaciones de reticulocitos en un sujeto tratado con el anticuerpo anti-TfR. Por tanto, en determinados modos de realización, al menos uno de otro agente terapéutico seleccionado por su capacidad de mitigar dicho efecto secundario negativo en las poblaciones de reticulocitos se coadministra con un anticuerpo anti-TfR de la invención. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes para incrementar las poblaciones de glóbulos rojos (es decir, reticulocitos), agentes para apoyar el crecimiento y desarrollo de glóbulos rojos (es decir, reticulocitos) y agentes para proteger poblaciones de glóbulos rojos frente a los efectos del anticuerpo anti-TfR; dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, eritropoyetina (EPO), suplementos de hierro, vitamina C, ácido fólico y vitamina B12, así como reemplazo físico de glóbulos rojos (es decir, reticulocitos) mediante, por ejemplo, transfusión con células similares, que pueden ser de otro individuo de grupo sanguíneo similar o se pueden haber extraído previamente del sujeto al que se administra el anticuerpo anti-TfR. Se entenderá por un experto en la técnica que, en algunos casos, los agentes que pretenden proteger los glóbulos rojos existentes (es decir, reticulocitos) se administran preferentemente al sujeto antes de o simultáneamente con el tratamiento con anticuerpos anti-TfR, mientras que los agentes que pretenden apoyar o iniciar el nuevo crecimiento/ desarrollo de glóbulos rojos o poblaciones de glóbulos sanguíneos (es decir, reticulocitos o poblaciones de reticulocitos) se administran preferentemente simultáneamente con o después del tratamiento con anticuerpos anti-TfR de modo que dichos glóbulos sanguíneos se puedan reponer después del tratamiento con anticuerpos anti-TfR.

En determinados otros de dichos modos de realización, el al menos uno de otro agente terapéutico se selecciona por su capacidad de inhibir o prevenir la activación de la vía del complemento tras la administración del anticuerpo anti-TfR. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes que interfieren en la capacidad del anticuerpo anti-TfR para unirse a o activar la vía del complemento y agentes que inhiben una o más interacciones moleculares dentro de la vía del complemento, y se describen, en general, en Mollnes y Kirschfink (2006) Molec. Immunol. 43:107-121.

Dichas politerapias indicadas anteriormente y en el presente documento 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 del anticuerpo de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente y/o adyuvante terapéutico adicional. En un modo de realización, la administración del anticuerpo anti-TfR y la administración de un agente terapéutico adicional se

produce en aproximadamente un mes, o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en combinación con otros tratamientos de intervención, tales como, pero sin limitarse a, radioterapia, psicoterapia conductual u otros tratamientos conocidos en la técnica y apropiados para el trastorno neurológico que se va a tratar o prevenir.

Un anticuerpo anti-TfR de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas posológicas incluyendo, pero sin limitarse a, administraciones individuales o múltiples durante diversos puntos temporales, administración en bolo e infusión pulsada.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de forma consecuente con las buenas prácticas médicas. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no lo necesita, pero se puede formular opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión o para prevenir, mitigar o mejorar uno o más efectos secundarios de la administración de anticuerpos. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con las vías 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 por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si se administra el anticuerpo con propósitos preventivos o terapéuticos, tratamiento previo, anamnesis del paciente y respuesta al anticuerpo y el criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente 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 anticuerpo puede ser una dosificación inicial candidata para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede 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, el tratamiento en general se mantendría hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 40 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, 5,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg o 40 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. Se apreciará que un procedimiento para reducir el impacto sobre las poblaciones de reticulocitos por administración de anticuerpos anti-TfR es modificar la cantidad o el momento de las dosis de modo que estén presentes menores cantidades globales de anticuerpo circulante en la circulación sanguínea para interactuar con los reticulocitos. En un ejemplo no limitante, se puede administrar una dosis menor de los anticuerpos anti-TfR con mayor frecuencia que una dosis mayor. La dosificación usada se puede equilibrar entre la cantidad de anticuerpo necesaria para administrarse al SNC (relacionada por sí misma con la afinidad de la porción específica de antígeno del SNC del anticuerpo), la afinidad de ese anticuerpo por TfR y si se administra(n) o no conjuntamente o en serie compuesto(s) protector(es) de los glóbulos rojos (es decir, reticulocitos), estimulante(s) del crecimiento y desarrollo, o inhibidor(es) de la vía del complemento con el anticuerpo. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica.

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

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: GENERACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y HUMANIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TFR CON REACCIÓN CRUZADA DE HUMANO/MACACO CANGREJERO

Inicialmente, se realizó un proceso de selección de fagos con anticuerpos sin exposición previa en un intento de identificar anticuerpos con reactividad cruzada tanto con TfR humano como con TfR de macacos cangrejeros que además no competían con Tf por la unión a TfR (Lee et al. JMB (2004) 1073-1093). No se identificó ningún clon con reacción cruzada y que no compita con Tf a partir de este procedimiento de selección de fagos. Sin embargo, se identificaron dos anticuerpos que fueron útiles para caracterizar clones de hibridoma generados posteriormente.

Se identificó un anticuerpo de una especie con reacción cruzada que compite con Tf por unirse al TfR de humano o de macaco cangrejero (anticuerpo que compite con Tf). El epítipo de otro clon, específico para TfR humano, se cartografió en el dominio apical de huTfR usando receptores TfR quiméricos de ratón/humano (figura 1). Este clon de unión al dominio apical perdió la unión a huTfR cuando la secuencia de TfR de ratón en el dominio apical se sustituyó en huTfR.

A continuación, se realizó un enfoque basado en inmunización para generar anticuerpos anti-TfR de humano/macaco cangrejero con reacción cruzada. El dominio extracelular ("ecd") de TfR humano que contiene una etiqueta His N terminal y la proteína de hemacromatosis humana ("HFE") se expresaron y purificaron como se describe (Bennet et al, Nature (2000) 403, 46-53). También se hizo una construcción análoga de ecd de TfR de macaco cangrejero. Se expresó TfR de macaco cangrejero y se purificó de forma similar. Se generaron anticuerpos anti-TfR con reacción cruzada de humano y macaco cangrejero inmunizando 5 ratones Balb/C en la almohadilla plantar con 6 dosis (dos veces por semana) que contenían 2 µg cada una de TfR de macaco cangrejero y ecd de huTfR. Todos los sueros de ratones fueron positivos por FACS y todos los ratones se fusionaron. De 1632 hibridomas cribados, 111 fueron positivos por ELISA para la unión a TfR tanto de humano como de macaco cangrejero.

Los hibridomas positivos por ELISA resultantes se cribaron por FACS en presencia de holo-Tf humano 1 µM para determinar su unión a células 293 que expresan de forma transitoria TfR humano o de macaco cangrejero. En resumen, el análisis por FACS se realizó usando 293 células transfectadas con TfR humano o de macaco cangrejero de longitud completa usando lipofectamin 2000 plus (Invitrogen) 48-72 h antes del análisis por FACS. Se lavaron células 293 no transfectadas (control) y transfectadas dos veces con tampón de FACS (PBS que contiene BSA al 1 %), se añadió 50 µl de sobrenadante de hibridoma (normalizado a 10 µg/ml) a células 293 en presencia de holo-Tf humano 1 µM y se incubó en hielo durante 30 min. Se lavaron las células dos veces con tampón de FACS, se añadió 50 µl de PE-anti-Fcγ murino de cabra (Jackson ImmunoResearch) a las células y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se lavaron las células con tampón de FACS y se resuspendieron en de tampón de FACS 100 µl para su análisis.

14 clones fueron positivos para la unión a TfR tanto humano como de macaco cangrejero (figuras 2A y 2B). Estos clones se subclonaron adicionalmente y se evaluaron para determinar su unión a TfR tanto humano como de macaco cangrejero por ELISA, y se cartografió el epítipo en huTfR usando el clon del fago de unión apical identificado anteriormente. En resumen, el ELISA de competencia de fagos del dominio apical se realizó en placas maxisorp recubiertas con 2 µg/ml de TfR humano o de macaco cangrejero purificado en PBS a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se bloquearon usando Superblock con caseína (Thermo Scientific, Hudson, NH). Se añadió a cada pocillo una alícuota de 30 µl de sobrenadante de hibridoma (normalizado a 10 µg/ml) durante 45 min. A esto le siguió la adición de 30 µl de fago de unión al dominio apical a una DO de 0,05 durante 15 min. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se añadió HRP-anti M13 de ratón (GE Healthcare) diluido 1:1000 a la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se detectó el fago unido usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Se encontró que nueve de los catorce clones bloqueaban la unión del anticuerpo de unión apical presentado en el fago (véase la figura 2C).

Se midieron las afinidades de los anticuerpos usando resonancia de plasmón superficial ("SPR") (Biacore™, GE Healthcare). Se acopló anticuerpo anti-His (Qiagen) a cuatro cubetas de lectura diferentes de un chip de sensor BIACORE™ CM5 (Biacore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey) a entre 6000 y 8000 UR. Se logró la inmovilización por acoplamiento aleatorio a través de grupos amino usando un protocolo proporcionado por el fabricante. Se diluyó 10X HBS-P (Biacore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey) en agua y sirvió como tampón de dilución y migración. Se capturó TfR humano o de macaco cangrejero purificado, seguido de una serie de diluciones 1:3 de IgG o Fab que se inyectó a un caudal de 30 ml/min usando el procedimiento cinético de ciclo único. Se determinaron las constantes de afinidad usando un modelo de unión de Langmuir 1:1 simple o usando un modelo de estado de equilibrio cuando k_{as} o k_{dis} estaba más allá del límite de detección. La constante de disociación de equilibrio (KD) se calculó como la proporción entre la constante de la tasa de asociación (k_{as}) y la constante de la tasa de disociación (k_{dis}). Los resultados se muestran en la figura 2C.

Se clonó cada hibridoma. Se aisló ARN total de hibridoma usando un mini kit RNeasy (Qiagen). Se generó ADNc usando un kit de amplificación de ADNc SMART 5' RACE (Clontech) en base a las instrucciones del fabricante. Se amplificó la región variable de cada anticuerpo usando UPM (5' oligo) proporcionado en el kit y un 3' oligo que hibrida con la región constante. A continuación, se clonó el producto de PCR completo en vector pCR4Blunt Topo (Invitrogen) para la secuenciación. Después del análisis de la secuencia, los hibridomas se podían subdividir

adicionalmente en 4 grupos (figuras 3A-3D). Los clones que compitieron con el anticuerpo de unión apical se clasificaron en 3 clases de secuencia relacionadas (figura 3 AC). Los 4 clones no apicales (Figura 3D) consistieron en 2 clones relacionados y otras 2 secuencias únicas. Las CDR de las cadenas ligera y pesada de cada clon se proporcionan en la tabla 3.

5

TABLA 3: CDR de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos anti-TfR humanos/de macaco cangrejero con reactividad cruzada

Nombre del clon	Pesada/Ligera	HVR1	SEQ ID NO	HVR2	SEQ ID NO	HVR3	SEQ ID NO
7A4	Ligera	RASESVDSYGNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNEAPPT	31
	Pesada	DYAMH	32	GISTYFGRTNYNQKFKG	33	GLSGNYVMDY	34
8A2	Ligera	RASESVDSYGNSFMH	35	RASNLES	30	QQSNEGPPT	36
	Pesada	DYGMH	37	VISPYSGRRTNYNQNFKG	38	GLSGNYVVDY	39
15D2	Ligera	RASESVDSYGNSFMH	35	RASNLES	30	QQSNEGPPT	36
	Pesada	DYAMH	32	VISFYSGKTNYNQKFMG	40	GLSGNYVMDY	34
10D11	Ligera	RASESVDSYGNSFMH	41	RASNLES	30	QHSNEDPPT	42
	Pesada	DYGMH	37	VISPYSGKTNYSQKFKG	43	GLSGNFVMDY	44
7B10	Ligera	RASESVDSYGNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNEAPPT	31
	Pesada	DYAMH	32	GISTYFGRTNYNQKFKG	33	GLSGNYVMDY	34
CDR ligeras de clase I de consenso		RAS-ESVD(S/D)Y(G/N/P)SFMH	45	RASNLES	30	Q(Q/H)SNE(A/G/D)PPT	46
CDR pesadas de clase I de consenso		DY(A/G)MH	47	(G/V)IS(TZF/P)Y(F/S)G(R/K)TNY(N/S)Q(K/N)F(K/M)G	48	GLSGN(Y/F)V(M/V)D(Y/F)	49
15G11	Ligera	RASDNLYSNLA	50	DATNLAD	51	QHFWGTPLT	52
	Pesada	SYWMH	53	EINPTNGRTNYIEKFKS	54	GTRAYHY	55
16G5	Ligera	RASENIYSNLA	56	AATDLAD	57	QHFWGTPLT	52
	Pesada	SYWMH	53	EINPTNGRTNYNENFKS	58	GTRAYHF	59
13C3	Ligera	RASDNLYSNLA	60	AATNLAD	61	QHFWGTPLM	62
	Pesada	SYWMH	53	EINPTNGRTNYSEKFKK	63	GTRAYHY	55
16G4	Ligera	RASDNLYSNLA	60	AVTNLAD	64	QHFWGTPLT	52
	Pesada	SYWMH	53	EINPSNGRTNYNETFKS	65	GTRAYHY	55
CDR ligeras de clase II de consenso		RAS(E/D)N(L/I)YSNLA	66	(D/A)(A/V)T(N/D)LAD	67	QHFWGTPL(T/M)	68
CDR pesadas de clase II de consenso		SYWMH	53	EINP(T/I/S)NGRTNY(I/N/S)E(K/N/T)FK(S/K)	69	GTRAYH(Y/F)	70
16F6	Ligera	RASKSISKYLA	71	SGSTLQS	72	QQHNEYPT	73
	Pesada	SEYAWN	74	YISYSGTTSYNPSLKS	75	YGYG-NPATRYFDV	76
7G7	Ligera	RARQSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Pesada	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDERFKS	81	GGYDSRAW-FAY	82
4C2	Ligera	RARQSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Pesada	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDEKFKS	83	GGYDSRAW-FAH	84
1B12	Ligera	TTSSSVPSYFH	85	STSNLAS	86	HQYHRSPFT	87
	Pesada	DYYMY	88	SISNGGDNTTYYPDTVKG	89	QGAL-YDGYR-GAMDY	90

13D4	Ligera	RAGQDITNYLN	91	YTSRLHS	92	QQANTLPYT	93
	Pesada	NYWIE	94	EILPGSGSTKYNEKFKG	95	RGGYGYD-GEFAY	96
CDR ligeras de clase IV de consenso		(R/T)(A/T)(R/S/G)(Q/S)(S/-)(V/-)(S/-)(T/-)(S/N/D)(S/P/I)(Y/S/T)(S/N)(F/Y)(M/F/L)(H/N)	97	(Y/S)(A/T)S(I/N/R)(Q/L)(E/A/H)S	98	(Q/H)(H/Q)(T/Y/AXW/H/N)(E/R/T)(I/SL)P(F/Y)T	99
CDR pesadas de clase IV de consenso		(S/D/N)Y(W/Y)(M/I)(H/Y/E)	100	(N/S/E)I(Y/S/L)(P/N)G(S/G)(G/D)(S/N)T(K/Y)Y(D/P/N)(E/D)(R/K/T)(FW)K(S/G)	101	(G/Q/R)G(Y/A/G)(D/L/Y)(S/Y/G)(R/D/Y)(A/G/D)(W/Y/G)(F/Y/E)(R/F/-G/-A/-)(M/-)(A/D)(Y/H)	102

En el presente documento se ejemplifican clones representativos de cada clase (15G11, 7A4, 16F6 y 7G7) para humanización y caracterización adicional. La humanización se logró utilizando injertos de HVR junto con la inclusión de posiciones vernier seleccionadas como se explica a continuación y en las figuras 4A-4E. Se humanizó 15G11 injertando las HVR en los dominios variables humanos IGKV1-NL1*01 e IGHV1-3*01. Se incluyeron combinaciones de diferentes posiciones vernier de ratón en las variantes humanizadas como se explica en la figura 4E. La variante 15G11 humanizada 15G11.v5 contiene posiciones vernier seleccionadas en VL (posiciones 43 y 48) y VH (posiciones 48, 67, 69, 71 y 73) como se explica en la figura 4A. Además, el extremo N de VH se cambió de Q a E. Para la humanización de 7A4, se hizo un injerto de HVR usando las HVR de la cadena pesada 7A4 y de la cadena ligera 8A2 (7A4 y 8A2 son clones relacionados, figura 3A). Se injertaron HVR en los dominios variables humanos IGKV4-1*01 e IGHV1-2*02. Se incluyeron combinaciones de diferentes posiciones vernier de ratón en las variantes humanizadas como se explica en la figura 4E. La variante 7A4 humanizada, 7A4.v15, contiene posiciones vernier seleccionadas en VL (posición 68) y VH (posiciones 24 y 71) y el cambio de CDR-L3 G94A, como se explica en la figura 4B. Se humanizó 7G7 injertando las HVR en los dominios variables de consenso humanos kappa 4 y del subgrupo I junto con posiciones vernier seleccionadas en VH (posición 93) como se explica en la figura 4C. Esta variante humanizada se llama 7G7.v1. Se humanizó 16F6 injertando las HVR en los dominios variables humanos IGKV1-9*01 e IGHV4-59*01. Se incluyeron combinaciones de diferentes posiciones vernier de ratón en las variantes humanizadas como se explica en la figura 4E. La variante 16F6 humanizada 16F6.v4 contiene 2 cambios en VL (I48L y F71Y), así como posiciones vernier seleccionadas en VL (posiciones 43 y 44) y VH (posiciones 71 y 78), como se explica en la figura 4D.

TABLA 4: CDR de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos/Fabs humanizados

Nombre del clon	Pesada/Ligera	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
15G11.v5	Ligera	RASDNLYSNLA	50	DATNLAD	51	QHFWGTPLT	52
	Pesada	SYWMH	53	EINPTNGRTNYIEKFKS	54	GTRAYHY	55
7A4.V15	Ligera	RASESVDSYGNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNEAPPT	127
	Pesada	DYAMH	32	GISTY-FGRTNYNQKFKG	33	GLSGNYVMDY	34
7G7.V1	Ligera	RARQSVSTSSSYFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Pesada	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDERFKS	81	GGYDSRAW-FAY	82
16F6.V4	Ligera	RASKSISKYLA	71	SGSTLQS	72	QQHNEYPT	73
	Pesada	SEYAWN	74	YISYSGTTSYNPSLKS	75	YGYG-NPATRYFDV	76

La afinidad de las variantes humanizadas por el TfR humano y de macaco cangrejero se determinó por SPR como IgG (figura 4E). Los clones seleccionados también se analizaron por SPR como Fab para evaluar la afinidad monovalente (tabla 7). En ambos casos, los experimentos por SPR se realizaron como se describe anteriormente.

TABLA 5: Datos de unión por Biacore para variantes con formato Fab seleccionadas

	HuTfR	TfR de mac. cangr.	Mac. cangr./hu
--	-------	--------------------	----------------

Muestra	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	proporción
Mu15G11.Fab	1.38E+06	4.65E-03	3.37E-09	1.07E+06	6.23E-03	5.81E-09	1,72
Mu15G11.Fab	6.34E+05	1.52E-03	2.41E-09	4.85E+05	3.68E-03	7.57E-09	3,15
Hu15G11.v1.Fab	6.38E+05	0,006986	1.09E-08	5.05E+05	0,0373	7.39E-08	
Hu15G11.v3.Fab	6.42E+05	0,004657	7.26E-09	4.83E+05	0,0201	1.09E-08	
Hu15G11.v5.Fab	4.56E+05	0,004063	8.91E-09				
Hu15G11.v5.Fab	7.76E+05	0,003643	4.70E-09	1.41E+06	0,02184	1.56E-08	3,4
Mu7A4.Fab	1.65E+06	3.13E-04	1.90E-10	1.14E+06	8.45E-04	7.41E-10	3,9
Hu7A4.v5.Fab	2.24E+06	1.53E-03	6.86E-10	1.18E+06	6.41E-03	5.44E-09	
Hu7A4.v8.Fab	9.28E+05	1.07E-03	1.15E-09	7.97E+05	6.81E-03	8.55E-09	
Hu7A4.v9.Fab	1.71E+06	6.86E-04	4.01E-10	8.08E+05	3.42E-03	4.23E-09	
Hu7A4.v12.Fab	3.32E+06	8.44E-04	2.55E-10	1.74E+06	3.31E-03	1.90E-09	
hu7A4.v15.Fab	9.10E+05	3.17E-04	3.48E-10	3.78E+05	0,001618	4.28E-09	11
Fab de Hu7G7.v1	1.44E+05	0,006594	4.58E-08	3.84E+04	0,007231	1.88E-07	4,4
Mu16F6.Fab	6.07E+04	1.90E-04	3.13E-09	5.11E+04	1.37E-03	2.68E-08	8,56
Hu16F6.v4.Fab	1.31E+05	1.69E-04	1.29E-09	9.89E+04	2.44E-03	2.47E-08	19,1

El epítipo de unión de los anticuerpos se volvió a confirmar como sigue. Se realizó un ELISA de bloqueo de Tf-TfR en placas maxisorp recubiertas con 2 µg/ml de TfR humano purificado en PBS a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Se añadió a las placas 50 µl de holo-Tf humano 12,5 µM (R&D Systems, Minneapolis, MN) durante 40 min. Se añadió a la placa una valoración de 50 µl de hu7A4.v15, hu15G11.v5, anticuerpo competitivo Tf y hu7G7.v1 (comenzando con 10 µg/ml, dilución en serie 1:3) y se incubó durante 20 min. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se añadió HRP-anti-Fcγ humano de cabra diluido 1:1000 (Jackson ImmunoResearch) a la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se detectaron usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

Se realizó un ELISA de unión de HFE-TfR en placas maxisorp recubiertas con 1 µg/ml de HFE en PBS a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Se añadió a la placa una valoración de TfR humano (comenzando con 100 µg/ml, dilución en serie 1:3) y se incubó durante 1 h. A continuación, se añadió a la placa 1 µg/ml de hu15G11.v5, hu7A4.v15 o hu7G7.v1 durante 1 h. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se añadió HRP-anti-Fcγ humano de cabra diluido 1:1000 (Jackson ImmunoResearch) a la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se detectaron usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Se realizó un ELISA de bloqueo de HFE-TfR en placas maxisorp recubiertas con 1 µg/ml de HFE en PBS a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). En una placa NUNC™, se combinó una valoración de hu7A4.v15, hu15G11.v5, anticuerpo competitivo de Tf, holo-Tf humano e IgG de control (400 pg para todos los anticuerpos, 8000 pg/ml para holo transferrina, dilución en serie 1:3) con 2 µg/ml de TfR humano biotinilado y se incubó durante 1 h. A continuación, se añadió la mezcla a la placa recubierta de HFE durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se añadió HRP-streptavidina (SouthernBiotech, Birmingham) diluido 1:1000 a la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 %, y se detectó TfR humano biotinilado unido a la placa usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

La unión de estas variantes humanizadas a TfR no se vio afectada por la presencia de holo-Tf 6,3 µM, mientras que la unión del anticuerpo competitivo de Tf que se une al sitio de unión de Tf en TfR se inhibió (figura 5). Además,

7A4.v15, 15G11.v5 y 7G7.v1 humanizadas todavía se podían unir a huTfR capturado con HFE, lo que indica que no afectaron a la unión de huTfR a HFE inmovilizada (figura 6A). En un experimento relacionado, 7A4.v15 y 15G11.v5 no bloquearon la unión de TfR biotinilado a HFE inmovilizada. Por el contrario, esta interacción se bloqueó por el anticuerpo competitivo de Tf y holo Tf (figura 6B). HFE y Tf son conocidos por compartir un epitopo similar en TfR (Bennet et al, Nature (2000) 403, 46-53).

Se evaluó la unión de 15G11.v5 y anti-TfRC12 inmovilizados al ECD de TfR humano biotinilado o al fago M13 monovalente que presenta el dominio apical de TfR humano. Se derivó Anti-TfRC12 de una colección de fagos de anticuerpos sintéticos que se seleccionó frente a ECD de TfR humano y se une a un sitio en TfR humano que compete con la unión a transferrina. Se recubrieron los anticuerpos con 1 µg/ml en PBS en placas Maxisorp. Se detectaron ECD de TfR humano biotinilado unido o fagos de dominio apical de TfR con HRP-estreptavidina (GE Health Care, RPN 4401V) o HRP-anti-M13 (GE Health Care, 27-9421-01), respectivamente. La figura 25 muestra que 15G11.v5 se une al dominio apical de TfR humano. El sitio de unión de 15G11.v5 se cartografió en el dominio apical, un sitio distante de los sitios de unión del ligando de TfR.

EJEMPLO 2: GENOMANIPULACIÓN POR AFINIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-TFR CON REACTIVIDAD CRUZADA HUMANOS/DE MACACO CANGREJERO

Además de las variantes humanizadas descritas anteriormente, se crearon variantes adicionales genomanipladas por afinidad. En el presente documento se ejemplifica la genomaniplación por afinidad de 15G11.v5 y 7A4.v15. Se generaron variantes de afinidad realizando sustituciones de alanina individuales en CDR-L3 o CDR-H3 usando técnicas estándar. Estas variantes se cribaron como IgG por ELISA y SPR para identificar posiciones importantes para la unión a TfR humano y de macaco cangrejero; también se determinó la afinidad monovalente de variantes seleccionadas como Fab. Se expresaron IgG o Fab variantes por barrido de Ala en células 293 y se cuantificó la unión a TfR humano o de macaco cangrejero por ELISA en placas maxisorp recubiertas con 1,8 µg/ml de anti-Fcγ humano de cabra (Jackson ImmunoResearch) en PBS a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Se diluyeron en serie 1:5 los sobrenadantes que contenían IgG expresada y se añadieron a la placa durante 1 h. Se usaron hu15G11.v5 o hu7A4.v15 purificados como estándares (diluidos 1:5 comenzando en 1 µg/ml). Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se añadió HRP-anti-kappa de cabra diluido 1:1000 (Southern Biotech) a la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se detectaron usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). También se evaluó la unión por SPR, como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en las figuras 7A (variantes 15G11.v5) y 7B (variantes 7A4.v15).

También se generaron otras variantes de 15G11.v5 con sustituciones de alanina individuales en posiciones en CDR-L1, CDR-L2, CDR-H1 y CDR-H2, se expresaron y se cribaron en primer lugar por la unión a TfR humano y de macaco cangrejero por ELISA (tabla 6). El ELISA de unión a Hu/de macaco cangrejero se realizó en placas maxisorp recubiertas con 2 µg/ml de TfR humano o de macaco cangrejero purificado en PBS a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Se diluyeron en serie 1:5 sobrenadantes de cultivo celular que contenían IgG variantes de barrido de Ala expresadas y se añadieron a los pocillos durante 1 h. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se añadió HRP-anti-Fcγ humano de cabra diluido 1:1000 (Jackson ImmunoResearch) a la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0,05 % y se detectaron usando sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

TABLA 6: Análisis por ELISA de variantes de IgG hu15G11.v5 de barrido de alanina

			CE50 de TfR de macaco cangrejero (ng/ml)	CE50 de HuTfR (ng/ml)
		15G11.v5	1,8	0,8
HVR-H1		G26A	6,1	1,1
		Y27A	1467,1	21,1
		T28A	0,8	0,4
		F29A	12,5	1,5
		T30A	0,9	0,4
		S31A	0,1	0,05
		Y32A	1,4	0,4
		W33A	362,5	59,6

		M34A	1,1	0,4
HVR-H2		G49A	1,1	0,3
		E50A	409,7	20,6
		I51A	0,6	0,2
		N52A	0,9	0,3
		P52aA	8,1	3,9
		T53A	0,7	0,3
		R56A	5405,4	55,1
		N58A	80,4	6,3
		Y59A	0,7	0,3
		I60A	0,7	0,3
		E61A	0,6	0,2
		K62A	0,7	0,3
		F63A	0,6	0,4
		K64A	0,6	0,3
		S65A	0,7	0,2
HVRL1		R24A	0,4	0,1
		S26A	0,6	0,2
		D27A	0,8	0,2
		N28A	0,8	0,2
		L29A	0,9	0,3
		Y30A	1,0	0,3
		S31A	0,7	0,3
		N32A	4,0	1,6
		L33A	0,1	0,05
H		D50A	0,5	0,2
		T52A	0,3	0,2
		N53A	0,6	0,3
		L54A	0,5	0,4
		D56A	0,5	0,3

A continuación, se purificaron variantes seleccionadas y se evaluó su afinidad monovalente por TfR humano o macaco cangrejero por SPR (tabla 7).

5 **TABLA 7: Análisis por SPR monovalente de variantes seleccionadas de Fab de 15G11.v5 de barrido de alanina**

	HuTfR			TfR de mac. cangr.			Mac. cangr./hu
	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	proporción
Fab de Hu15G11.v5	6.74E+05	4.74E-03	7.03E-09	4.51E+05	1.27E-02	2.82E-08	4,0
Fab de Hu15G11.HC32A	2.38E+05	1.78E-03	7.47E-09	1.77E+05	8.51E-03	4.80E-08	6,4
Fab de Hu15G11.HC34A	5.64E+05	4.03E-03	7.14E-09	3.04E+05	9.90E-03	3.26E-08	4,6
Fab de Hu15G11.HC52A	5.30E+05	2.36E-02	4.44E-08	4.87E+05	5.67E-02	1.17E-07	2,6

Fab de Hu15G11.HC52A	5.64E+05	1.96E-02	3.46E-08	nd	nd	nd	nd
Fab de Hu15G11.HC51A	4.33E+05	1.04E-02	2.39E-08	3.13E+05	3.29E-02	1.05E-07	4,4
Fab de Hu15G11.HC53A	8.90E+05	1.15E-02	1.29E-08	4.84E+05	2.50E-02	5.18E-08	4,0
Fab de Hu15G11.HC54A	2.06E+05	8.71E-03	4.24E-08	2.80E+05	1.69E-02	6.02E-08	1,4

EJEMPLO 3: CONSTRUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TfR HUMANOS BISPECÍFICOS Y ANÁLISIS IN VITRO

5 Determinadas de las variantes de anticuerpos anteriores se reformatearon como anticuerpos biespecíficos con un segundo brazo que se unía específicamente a BACE1. Los anticuerpos anti-TfR humano Hu15G11.v5, Hu15G11.LC92A, Hu15G11.HC52A y Hu15G11.HC53A se usaron para genomanipular el brazo de unión a TfR del biespecífico usando la tecnología de construcción de anticuerpos biespecíficos 'botón en ojal' (Carter, P. (2001) J. Immunol. Methods 248, 7-15; Ridgway, J. B., Presta, L. G., y Carter, P. (1996) Protein Eng. 9, 617-621; Merchant, A. M., Zhu, Z., Yuan, J. Q., Goddard, A., Adams, C. W., Presta, L. G., y Carter, P. (1998) Nat. Biotechnol. 16, 677-681; Atwell, S., Ridgway, J. B., Wells, J. A., y Carter, P. (1997) J. Mol. Biol. 270, 26-35). Además de las mutaciones de botón en ojal en Fc para anti-TfR (ojal) y anti-BACE1 (botón), todos los semianticuerpos contenían mutaciones en la región Fc que anulaban la función efectora (N297G) y Hu15G11.v5 y Hu15G11.LC92A contenía una mutación de Fc adicional que anulaba la función efectora (D265A). Los semianticuerpos de botón en ojal se purificaron por separado de *E. coli* y se combinaron en una proporción de 1:1,1 de anti-TfR para evitar la formación de homodímeros anti-TfR. Se completó el ensamblaje del anticuerpo biespecífico se completó por hibridación reductora durante al menos tres días a temperatura ambiente en un tampón que contenía glutatión reducido en una proporción de 100x con respecto al anticuerpo y arginina 200 mM, pH 8,0. Después del ensamblaje, se purificaron los anticuerpos biespecíficos por cromatografía de interacción hidrófoba. Se confirmó el ensamblaje por espectroscopía de masas acoplada a cromatografía de líquidos y SDS-PAGE. Se confirmó que los anticuerpos purificados eran homogéneos y monodispersos por exclusión por tamaño y espectroscopia de luz láser de múltiples ángulos.

Los anticuerpos biespecíficos resultantes se llamaron 15G11.v5 (anti-TfR1), 15G11.W92A (15G11.LC92A o anti-TfR2), Hu15G11.N52A (anti-TfR52A) y Hu15G11.T53A (anti-TfR53A). La afinidad monovalente y la cinética para TfR humano y de macaco cangrejero se determinaron para 15G11.v5 y 15G11.W92A por SPR, como anteriormente (véase la tabla 9). Anti-TfR1 y anti-TfR2 poseen afinidades de unión monovalente similares a las que tienen anti-TfRA y anti-TfRD por la unión a TfR de ratón (véase Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3, 84ra43 (2011); Yu et al., Sci. Transl. Med. 25 de mayo de 2011: vol. 3, Número 84, pág. 84ra44).

TABLA 8: Análisis por SPR monovalente de 15G11.v5 (TfR1) y 15G11.W92A (LC92A, TfR2)

	HuTfR			TfR de mac. cangr.			Proporción mac. cangr./humano
	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Fab de Hu15G11.v5	6.74E+05	4.74E-03	7.03E-09	4.51E+05	1.27E-02	2.82E-08	4,0
Hu15G11.W92A biespecífico	1.28E+05	3.77E-02	2.95E-07	8.36E+04	5.20E-02	6.22E-07	2,1

Adicionalmente, se midió la afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos anti-TfR1, anti-TfR2, Hu15G11.N52A y Hu15G11.T53A contra TfR humano y de macaco cangrejero por SPR como se describe previamente. Como se muestra en la tabla 9 a continuación, anti-TfR52A y anti-TfR53A tienen afinidades de unión por TfR humano y de macaco cangrejero entre TfR1h15G11.v5 y TfR2LC92A.

TABLA 9

Anticuerpos anti-TfR de macaco cangrejero/humano (nM)		
	TfR humano	TfR de macaco cangrejero
TfR1 ^{h15G11.v5}	10	37

TfR ^{LC92A}	270	810
TfR ^{52A}	52	343
TfR ^{53A}	24	143

EJEMPLO 4: IMPACTO DE ANTICUERPOS MONOESPECÍFICOS Y BISPECÍFICOS QUE CONTIENEN FUNCIÓN EFECTORA Y SIN FUNCIÓN EFECTORA EN UNA LÍNEA CELULAR DE ERITROLEUCEMIA HUMANA Y CÉLULAS MONONUCLEARES PRIMARIAS DE LA MÉDULA ÓSEA

Estudios previos en ratones habían determinado que los anticuerpos que se unían a TfR murino con función efectora y/o capacidades de unión al complemento disminuían selectivamente los reticulocitos que expresaban TfR. Para determinar si la disminución observada en los estudios en ratones era exclusiva de un sistema murino, se realizaron otros experimentos utilizando anti-TfR que se unen a TfR humano.

Se llevaron a cabo ensayos de ADCC usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes humanos sanos como células efectoras. Como células diana se usaron una línea celular de eritroleucemia humana (HEL, ATCC) y células mononucleares primarias de médula ósea humana (AllCells, Inc.). Para minimizar la variabilidad entre donantes que potencialmente podía surgir de diferencias alotípicas en la posición del residuo 158 en FcγRIIIA, se limitaron los donantes de sangre a los que portaban el genotipo heterocigótico RcyRIIIA (F/V158) en el primer conjunto de experimentos (figura 8A-B). Para el segundo conjunto de experimentos (figura 9A-B), solo se usaron células HEL como células diana, con PBMC de donantes humanos sanos que portaban el genotipo F/V158 o bien el genotipo FcγRIIIA V/V158. El genotipo V/V158 también se incluyó en este ensayo debido a la asociación conocida con una actividad incrementada de ADCC mediada por linfocitos NK, así como la capacidad de unirse a anticuerpos IgG4 (Bowles y Weiner, 2005; Bruhns et al. 2008). Se contaron las células y se determinó la viabilidad por Vi-CELL® (Beckman Coulter; Fullerton, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se aislaron las PBMC por centrifugación en gradiente de densidad usando tubos de separación de sangre Uni-Sep™ (Accurate Chemical & Scientific Corp.; Westbury, NY). Se sembraron células diana en 50 µl de medio de ensayo (RPMI-1640 con BSA al 1 % y 100 unidades/ml de penicilina y estreptomycin) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos a 4 x 104/pocillo. Se añadieron diluciones en serie de anticuerpos de prueba y de control (50 µl/pocillo) a las placas que contenían las células diana, seguido de incubación a 37 °C con 5 % de CO2 durante 30 minutos para permitir la opsonización. Las concentraciones finales de anticuerpos variaron de 0,0051 a 10 000 ng/ml después de diluciones en serie 1:5 para un total de 10 puntos de datos. Después de la incubación, se añadieron a cada pocillo 1,0 x 106 células efectoras PBMC en 100 µl de medio de ensayo para dar una proporción de 25:1 de células efectoras:diana, y se incubaron las placas durante 4 horas adicionales. Se centrifugaron las placas al final de la incubación y se sometieron a prueba los sobrenadantes para determinar la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) usando un CytotoxicityDetection Kit™ (Roche Applied Science; Indianápolis, IN). Se añadió la mezcla de reacción de LDH a los sobrenadantes y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación constante. Se terminó la reacción con H3PO4 1 M y se midió la absorbancia a 490 nm (se restó el fondo, medido a 650 nm, para cada pocillo) usando un lector de microplacas SpectraMax Plus. La absorbancia de los pocillos que contenían solo las células diana sirvió como control para el fondo (control bajo), mientras que los pocillos que contenían células diana lisadas con Triton-X100 proporcionaron la señal máxima disponible (control alto). Se midió la citotoxicidad celular independiente de anticuerpos (AICC) en pocillos que contenían células diana y efectoras sin la adición de anticuerpos. El alcance de la ADCC específica se calculó como sigue:

$$\% \text{ ADCC} = 100 \times \frac{A_{490} (\text{Muestra}) - A_{490} (\text{AICC})}{A_{490} (\text{Control alto}) - A_{490} (\text{Control bajo})}$$

Se trazó la curva de los valores de ADCC de las diluciones de la muestra frente a la concentración de anticuerpos y se ajustaron las curvas de dosis-respuesta a un modelo de cuatro parámetros usando SoftMax Pro.

En un primer conjunto de experimentos, se evaluó la actividad ADCC de diversas construcciones de anti-TfR humano usando una línea celular de eritroleucemia humana (células HEL) o bien células mononucleares primarias de médula ósea humana como células diana. Se sometieron a prueba el anticuerpo anti-TfR1 humano bivalente IgG1 y competente en función efectora 15G11, y una forma biespecífica de este anticuerpo con un brazo anti-BACE1 en un formato de IgG1 humana que contiene mutaciones D265A y N297G para anular la función efectora (véase el ejemplo 3), en diversas concentraciones en el ensayo ADCC, usando IgG1 anti-gD WT como control negativo y anti-HLA humano murino (clase I) como control positivo. Los resultados se muestran en las figuras 8A y 8B. Con las células HEL como dianas (fig. 8A) o bien con las células mononucleares de la médula ósea como dianas (fig. 8B), el anticuerpo anti-TfR humano efector positivo mono específico 15G11 provocó una actividad de

ADCC significativa. Esta actividad fue similar a la de los anticuerpos anti-HLA humanos de control positivo en las células HEL, y en un nivel robusto aún menor con respecto al control positivo en las células mononucleares de la médula ósea. El nivel algo menor observado en el experimento de células mononucleares de médula ósea probablemente se deba al hecho de que solo una porción de la mezcla heterogénea de células PBMC de linaje

mieloide y eritroide usadas en el experimento expresa niveles altos de TfR, mientras que las células HEL tienen una expresión de TfR consecuentemente alta en toda la población de células clonales. En marcado contraste, el anticuerpo anti-TfR/BACE1 humano biespecífico sin función efectora no mostró ninguna actividad de ADCC ni en las células HEL ni en las mononucleares de médula ósea, similar al control negativo.

En un segundo conjunto de experimentos, se evaluó el impacto del cambio de isotipo del anticuerpo en este sistema de ensayo. El procedimiento de ensayo de ADCC fue idéntico al descrito anteriormente, con la excepción de que todas las células diana eran células HEL y las células efectoras eran PBMC de donantes humanos sanos que portaban el genotipo FcγRIIIa-V/F158 heterocigótico o el genotipo FcγRIIIa-V/V158 homocigótico. Todos los anti-TfR humanos sometidos a prueba fueron biespecíficos con anti-gD, en tres cadenas principales de Ig diferentes: IgG1 humana natural, IgG1 humana con la mutación N297G e IgG4 humana. También se sometió a prueba un anticuerpo anti-Abeta con una cadena principal de IgG4 humana y anti-HLA humano de ratón (clase I) sirvió como control positivo. Los resultados se muestran en las figuras 9A y 9B. Como se anticipó en base a la asociación conocida entre la activación de las células efectoras y el genotipo V/V158 (Bowles y Weiner 2005), la actividad de ADCC fue provocada de forma más robusta por las PBMC de donante V/V158 (~45 % de las células diana impactadas) con respecto a donantes F/V158 (~25 % de las células diana impactadas) (compárese la fig. 9A con la fig. 9B). Anti-TfR/gD con la IgG1 natural indujo una ADCC robusta en células HEL, mientras que el anti-TfR/gD con IgG1 sin función efectora no mostró ninguna actividad de ADCC en células HEL, replicando los resultados del primer conjunto de experimentos. De forma notable, con concentraciones de 100 ng/ml o mayores, anti-TfR/gD del isotipo IgG4 mostró una actividad de ADCC leve. Esta actividad no se observó en los resultados de anti-Abeta IgG4, lo que indica que se requería la unión a TfR para la actividad de ADCC. Este hallazgo se correlaciona con informes previos de que la IgG4 tiene una función efectora mínima, pero mensurable (Adolffson et al., J. Neurosci. 32(28):9677-9689 (2012); van der Zee et al. Clin Exp. Immunol. 64: 415-422 (1986)); Tao et al., J. Exp. Med. 173:1025-1028 (1991)).

EJEMPLO 5: EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TfR/BACE1 HUMANOS BISPECÍFICOS IN VIVO

A. Estudio farmacocinético, farmacodinámico y de seguridad.

Para evaluar las concentraciones de fármaco, los efectos farmacodinámicos y la seguridad de los anticuerpos anti-TfR humanos biespecíficos in vivo, se dosificó a macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) anticuerpos biespecíficos usando el clon 15G11 de anticuerpo anti-TfR emparejado con el mismo brazo anti-BACE1 usado en ejemplos previos (anti-TfR1/BACE1), o clon 15G11.LC92A emparejado con el mismo brazo anti-BACE1 usado en ejemplos previos (anti-TfR2/BACE1) o Hu15G11.N52A (anti-TfR52A/BACE1) y Hu15G11.T53A (anti-TfR53A/BACE1). Estos anticuerpos biespecíficos estaban en un formato de IgG1 humana con mutaciones N297G o D265A y N297G que anulaban la función efectora, como se describe previamente. Como control se usó una molécula anti-gD de IgG1 humana. Este estudio se realizó en primates no humanos porque la reactividad cruzada de estos anticuerpos anti-TfR se limita a primates no humanos y humanos. Además, los estudios han demostrado que los mecanismos de transporte de fármacos entre el líquido cefalorraquídeo (LCR) y los compartimentos plasmáticos pueden ser similares entre humanos y primates (Poplack et al, 1977). Se administraron los anticuerpos mediante una única inyección en bolo intravenoso (i.v.) en la vena safena a una dosis de 30 mg/kg a macacos cangrejeros conscientes con catéteres permanentes en la cisterna magna. En diversos momentos hasta 60 días después de la dosis, se tomaron muestras de plasma, suero y LCR). El análisis de las muestras incluyó hematología (sangre completa), bioquímica clínica (suero), concentraciones de anticuerpos (suero y LCR) y respuesta farmacodinámica al anticuerpo (plasma y LCR). Véase la figura 10 para consultar un esquema de muestreo detallado.

Las concentraciones de los anticuerpos dosificados en suero y LCR de macaco cangrejero se midieron con un ELISA usando una capa de anticuerpos absorbidos de mono de anti-IgG humana de oveja, seguido de la adición de muestras de suero comenzando con una dilución de 1:100, y finalizado con la adición de un anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante de mono adsorbido para detección. El ensayo tenía un intervalo de curva de calibración de 0,78-50 ng/ml y un límite de detección de 0,08 µg/ml. Los resultados por debajo de este límite de detección se informaron como inferiores a lo informable (LTR).

Las figuras 11A-B muestran los resultados del análisis farmacocinético para anti-TfR1/BACE1 y anti-TfR2/BACE1. El perfil farmacocinético de anti-gD fue como se esperaba para un anticuerpo IgG1 humano típico en macaco cangrejero con un aclaramiento medio de 3,98 ml/día/kg. Ambos anticuerpos anti-TfR/BACE1 se eliminaron más rápido que los anti-gD, probablemente debido al aclaramiento periférico mediado por la diana. Anti-TfR1/BACE1 tuvo el aclaramiento más rápido, consecuente con que tenga la mayor afinidad de unión a TfR, mientras que anti-TfR2/BACE1 mostró un perfil farmacocinético mejorado (es decir, exposición prolongada en suero) en comparación con anti-TfR1/BACE1, probablemente debido a su afinidad reducida por TfR. El aclaramiento de anti-TfR1/BACE1 y anti-TfR2/BACE1 fue de 18,9 ml/día/kg y 8,14 ml/día/kg, respectivamente. Todos los anticuerpos se detectaron en

el LCR a aproximadamente una milésima parte de la concentración en suero. Sin embargo, hubo una alta variabilidad y, en general, no hubo diferencias detectables en las concentraciones de anticuerpo en el LCR entre las moléculas.

TABLA 10: Estimaciones medias (\pm DE) de los parámetros farmacocinéticos FC para todos los anticuerpos de prueba después de la administración de una dosis única en bolo i.v. de 30 mg/kg en macacos cangrejeros (n=5)

Anticuerpo	AUC _{todos} (día* μ g/ml)	AUC _{inf} (día* μ g/ml)	C _{máx} (μ g/ml)	CL (ml/día/kg)	V _{ee} (ml/kg)
anti-gD	7640 \pm 1790		912 \pm 141	3,98 \pm 1,05	51,3 \pm 10,2
anti-TfR ¹ /BACE1	1610 \pm 240	7930 \pm 1910 1610 \pm 237	809 \pm 132	18,9 \pm 2,54	41,0 \pm 8,18
anti-TfR ² /BACE1	3750 \pm 528	3750 \pm 530	850 \pm 69,2	8,14 \pm 1,21	41,2 \pm 6,06

DE = desviación estándar; i.v. = intravenoso; AUC_{todos} = área bajo la curva de la concentración frente al tiempo desde el momento 0 hasta el momento de la última concentración mensurable; AUC_{inf} = área bajo la curva de la concentración frente al tiempo extrapolada al infinito; C_{máx} = concentración sérica máxima observada; CL = aclaramiento; V_{eq} = volumen de distribución en estado de equilibrio; Mín = mínimo; Máximo = máximo.

La figura 19 muestra los resultados del análisis farmacocinético para anti-TfR1/BACE1, anti-TfR52A/BACE1 y anti-TfR53A/BACE1. Todos los anticuerpos anti-TfR/BACE1 se eliminaron más rápido que los anti-gD, probablemente debido al aclaramiento periférico mediado por la diana. Anti-TfR1/BACE1 tuvo el aclaramiento más rápido, consecuente con que tenga la mayor afinidad de unión a TfR, mientras que anti-TfR52A/BACE1 y anti-TfR53A/BACE1 mostraron un perfil farmacocinético mejorado (es decir, exposición prolongada en suero) en comparación con anti-TfR1/BACE1, probablemente debido a la afinidad reducida por TfR de anti-TfR52A/BACE1 y anti-TfR53A/BACE1.

Para observar el efecto farmacodinámico en respuesta a la dosificación de anti-TfR/BACE1, se midieron los niveles de Abetal-40 y sAPP α y sAPP β en plasma y LCR de macacos cangrejeros. Se midió Abetal-40 con un ELISA usando un recubrimiento de anticuerpo policlonal específico anti-Abetal-40, seguido de la adición de muestras y, finalizando con la adición de un anticuerpo monoclonal anti-Abetal-40 humano de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante para la detección. El ensayo tiene un límite de detección de 60 pg/ml para plasma y 140 pg/ml para LCR. Los resultados por debajo de esta concentración se informaron como informes a lo informable (LTR). Se determinaron las concentraciones de sAPP α y sAPP β en el LCR usando el ensayo multipunto para sAPP α /sAPP β (Mesoscale Discovery (Gaithersburg, MD)). Se descongeló el LCR en hielo y, a continuación, se diluyó 1:10 en BSA al 1 % en TBS-T (tampón Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1 %). El ensayo se realizó según el protocolo del fabricante. El ensayo tenía un límite inferior de valores de cuantificación de 0,05 ng/ml para sAPP α y de 0,03 ng/g para sAPP β .

Las figuras 12A-E resumen el comportamiento farmacodinámico de los anticuerpos. En la periferia, los niveles de Abetal-40 en plasma permanecieron sin cambios después de la administración de anti-gD, pero disminuyeron de forma transitoria después de la administración de anti-TfR/BACE1. Ambas variantes redujeron los niveles de Abetal-40 en plasma, con una inhibición máxima del 50 % lograda 1 día después de la dosificación. Los niveles de Abetal-40 en plasma se recuperaron gradualmente y los animales a los que se dio anti-TfR1/BACE1 volvieron a los niveles de referencia de Abetal-40 alrededor de 14 días después de la dosis. Los niveles de Abetal-40 volvieron a los niveles de referencia entre 21 y 30 días después de la dosis en animales tratados con anti-TfR2/BACE1. Ambos anticuerpos anti-TfR/BACE1 redujeron los niveles de Abetal-40 en el LCR, sin que se observaran cambios en los animales a los que se dosificó anti-gD. La administración de anti-TfR1/BACE1 dio como resultado una disminución más significativa de los niveles de Abetal-40 en el LCR (inhibición máxima promedio del 50 % del valor de referencia) que la de anti-TfR2/BACE1 (inhibición máxima promedio del 20 % del valor de referencia). La producción de sAPP β se inhibió en los animales tratados con anti-TfR/BACE1, pero no en los animales que recibieron anti-gD. De forma similar a los resultados para A β 40, anti-TfR1/BACE1 tuvo un efecto inhibitor más fuerte sobre la producción de sAPP β que anti-TfR2/BACE1. La producción de sAPP α se estimuló durante la inhibición de BACE1 tanto por anti-TfR1/BACE1 como por anti-TfR2/BACE1, y la respuesta se correlacionó inversamente con el nivel de inhibición observado para sAPP β y Abetal-40. SAPP α y sAPP β son los principales productos de procesamiento de la proteína precursora amiloidea (APP) y sus niveles están altamente correlacionados. La proporción de sAPP β /sAPP α normaliza los resultados ante cambios potenciales en la expresión de APP de referencia o diferencias preanalíticas potenciales en la recogida y manipulación del LCR durante el transcurso del estudio. La proporción de sAPP β /sAPP α en LCR con anti-TfR1/BACE1 demostró un efecto FD más robusto que anti-TfR2/BACE1. Por tanto, estos resultados respaldan el acoplamiento en la diana (es decir, BACE1) por los anticuerpos anti-TfR/BACE1.

La respuesta FD para anti-TfR52A/BACE1 y anti-TfR53A/BACE1 también se correlaciona con la duración de la exposición al anticuerpo y un brazo de TfR con afinidad reducida muestra una reducción incrementada de A β 40 (datos no mostrados). Estos datos también respaldan el acoplamiento en la diana por estos anticuerpos biespecíficos.

En general, estos resultados sugieren que un anticuerpo anti-TfR/BACE1 biespecífico con una afinidad por TfR humano entre la de anti-TfR1/BACE1 y la de anti-TfR2/BACE1 probablemente tendría un equilibrio farmacocinético/farmacodinámico deseable.

No se observaron señales de seguridad en este estudio. No hubo efectos evidentes sobre ningún parámetro hematológico o de bioquímica clínica de los macacos a los que se administró 30 mg/kg de cualquier anticuerpo biespecífico hasta 60 días después de la dosis. Es importante destacar que los niveles de reticulocitos no se vieron afectados por el tratamiento con anti-TfR1/BACE1 o anti-TfR2/BACE1 (figura 13), como se esperaba, ya que estos anticuerpos tenían la función efectora deteriorada y el nivel total de reticulocitos iniciales circulantes con niveles altos de TfR es muy bajo en primates normales (véase el ejemplo 4).

EJEMPLO 6: EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TfR/BACE1 HUMANOS BISPECÍFICOS IN VIVO

Para examinar la relación entre la farmacodinámica de los anticuerpos en el LCR y la farmacocinética en el cerebro, se dosificó a macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) anticuerpos anti-TfR1/BACE1 o anti-TfR2/BACE1 biespecíficos, como en el ejemplo previo. Estos anticuerpos biespecíficos estaban en un formato de IgG1 humana con mutaciones D265A y N297G que anulaban la función efectora. Como control se usó una molécula anti-gD de IgG1 humana. Para comparación, también se dosificó un anticuerpo anti-BACE1 bivalente, que es el mismo clon usado para los anticuerpos biespecíficos. Se administraron los anticuerpos mediante una única inyección en bolo intravenoso (i.v.) en la vena safena a una dosis de 30 mg/kg a macacos cangrejeros conscientes con catéteres permanentes en la cisterna magna. Se recogieron muestras de LCR para valores de referencia 24 y 48 horas antes de la dosificación, y se recogió otra muestra de LCR 24 horas después de la dosis (como se muestra esquemáticamente en la figura 14). Después de la recogida de LCR 24 horas después de la dosis, se infundió a los animales solución salina y se recogieron los cerebros para el análisis de las concentraciones de anticuerpos. Se homogeneizaron regiones cerebrales diferentes en NP-40 (Cal-Biochem) al 1 % en PBS que contenía comprimidos de un cóctel de inhibidores de proteasa Complete Mini EDTA-free (Roche Diagnostics). Las muestras de cerebro homogeneizadas se agitaron a 4 °C durante 1 hora antes de su centrifugación a 14 000 rpm durante 20 minutos. Se aisló el sobrenadante para la medición de anticuerpos en el cerebro, usando el procedimiento ELISA descrito en el ejemplo previo. También se recogió sangre para confirmar la exposición periférica y las respuestas farmacodinámicas, que fueron similares a las observaciones en el ejemplo 5.

Los efectos farmacodinámicos de anti-TfR1/BACE1 y anti-TfR2/BACE1 evaluados en LCR también fueron similares a los observados en el ejemplo previo. La figura 15 demuestra que la proporción de sAPP β /sAPP α en el LCR disminuyó de forma robusta después de la dosificación con anti-TfR1/BACE1. Anti-TfR2/BACE1 no mostró una disminución evidente 24 horas después de la dosis en este estudio. Anti-BACE1 tampoco mostró ningún efecto. El análisis de las concentraciones cerebrales de anticuerpo reveló que tanto la IgG de control como el anticuerpo anti-BACE1 tenían una captación limitada en el cerebro, en niveles que estaban justo por encima de la detección en el ensayo (promedio ~670 pM). Anti-TfR2/BACE1 tuvo una captación mejorada ~3 veces en el cerebro frente a la IgG de control (promedio ~2 nM), y anti-TfR1/BACE1 tuvo la mejor captación en el cerebro, ~15 veces mayor que la de la IgG de control (promedio ~10 nM). Las concentraciones de anticuerpos en el cerebro para los diferentes anticuerpos se correlacionaron con la respuesta farmacodinámica observada en el LCR en los estudios, teniendo anti-TfR1/BACE1 la mejor captación en el cerebro y el efecto farmacodinámico más robusto, y teniendo anti-TfR2/BACE1 menos captación en el cerebro y un efecto más modesto.

Estos resultados amplían nuestros hallazgos previos para demostrar que los anticuerpos biespecíficos de unión a TfR mejoran la captación en el cerebro de primates no humanos. En primates, como en ratones, probable existe una afinidad óptima por TfR que equilibra mejor la captación en el cerebro y el aclaramiento mediado por TfR. En el ejemplo, el anti-TfR1/BACE1 de mayor afinidad demuestra una buena captación en el cerebro y se ve afectado por el aclaramiento periférico mediado por la diana. El TfR2/BACE1 de afinidad reducida tiene propiedades de aclaramiento mejoradas, pero parece tener una unión tan baja para TfR que no puede ser transportado eficazmente por TfR (de manera muy similar a como el anticuerpo anti-TfR de menor afinidad TfRE en el documento US2012/0171120 pasa algún umbral de afinidad más allá del cual la afinidad es demasiado baja para permitir una interacción suficiente entre el anticuerpo y TfR de modo que el anticuerpo permanecería asociado con TfR cuando TfR comienza el proceso de translocación). A partir de los resultados de este experimento, se pronostica que un anticuerpo biespecífico anti-TfR/BACE1 humano/de macaco cangrejero que tenga una afinidad por TfR entre la de TfR1 y TfR2 tendría propiedades de captación y aclaramiento mejoradas frente a anti-TfR1/BACE1 o bien anti-TfR2/BACE1 en este sistema.

EJEMPLO 7: CREACIÓN DE MUTACIONES ADICIONALES SIN FUNCIÓN EFECTORA EN EL CONTEXTO DE UN ANTICUERPO BISPECÍFICO DEL RECEPTOR DE TRANSFERRINA

Se sometieron a prueba otras mutaciones en la región Fc, que anulan la función efectora además de N297G y D265A, para determinar su capacidad para reducir o evitar la disminución de los reticulocitos que expresan TfR. Específicamente, las mutaciones de Fc L234A, L235A y P329G ("LALAPG") que se describen en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 2012/0251531 se incorporaron al anticuerpo anti-TfRD/BACE1 (que se describe en la publicación de solicitud internacional n.º WO 2013/177062).

El análisis farmacocinético y el recuento de reticulocitos después de una única administración de anticuerpo en ratones se realizaron como sigue. Para todos los estudios se usaron ratones hembra C57B/6 natural de 6-8 semanas de edad. El cuidado de los animales estuvo de acuerdo con las directrices institucionales. A los ratones se les dosificó por vía intravenosa una dosis única de 50 mg/kg de un anticuerpo anti-gD (IgG2a murino) con las mutaciones LALAPG, o bien un anticuerpo anti-TfRD/BACE1 (quimera de rata/murino) con las mutaciones LALAPG. El volumen total de inyección no superó los 250 µl y los anticuerpos se diluyeron en PBS-D cuando fue necesario (Invitrogen). Después de 24 horas, se recogió sangre completa antes de la infusión en tubos microtainer con EDTA (BD Diagnostics), se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000x g durante 10 minutos. Se transfirió la capa superior de plasma a tubos nuevos para mediciones de anticuerpos.

Se midieron las concentraciones de anticuerpos totales en plasma de ratón usando un ELISA anti-IgG2a de ratón (alotipo a)/anti-IgG2a de ratón (alotipo a). Se recubrieron placas inmunes Maxisorp de 384 pocillos NUNC (Neptune, Nueva Jersey) con anti-alotipo A de ratón de IgG2a de ratón, un anticuerpo específico de alotipo A (BD/Pharmingen San José, CA), durante la noche a 4 °C. Se bloquearon las placas con PBS, BSA al 0,5 % durante 1 hora a 25 °C. Cada anticuerpo (anti-gD y las variantes biespecíficas anti-TfR/BACE1) se usó como estándar para cuantificar las respectivas concentraciones de anticuerpo. Se lavaron las placas con PBS, Tween-20 al 0,05 % usando un lavador de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT), y se diluyeron los estándares y muestras en PBS que contenía BSA al 0,5 %, se añadieron NaCl 0,35 M, CHAPS al 0,25 %, EDTA 5 mM, BgG al 0,2 %, Tween-20 al 0,05 % y Proclin® 15 ppm (Sigma-Aldrich) durante dos horas a 25 °C. Se detectó el anticuerpo unido con anti-alotipo A de ratón de IgG2a de ratón conjugado con biotina, un anticuerpo específico del alotipo A (BD/Pharmingen San Jose, CA). Se detectó el anticuerpo unido conjugado con biotina con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Se revelaron las muestras usando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD) y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Se determinaron las concentraciones a partir de la curva de calibración usando un programa de regresión no lineal de cuatro parámetros. El ensayo tenía un límite inferior de valores de cuantificación (LLOQ) de 78,13 ng/ml en plasma. El análisis estadístico de las diferencias entre los grupos experimentales se realizó mediante una prueba de la T para datos independientes bilateral.

Tras la administración de los anticuerpos anti-TfRD/BACE1 que contienen las mutaciones de Fc LALAPG, los ratones no presentaron síntomas clínicos como se había observado previamente usando anticuerpos con función efectora completa. Véase Couch et al., *Sci. Trans. Med.* 5:183ra57 (2013). La figura 20 muestra los resultados del análisis farmacocinético.

Adicionalmente, se determinaron los recuentos de reticulocitos inmaduros y totales usando el Sysmex XT2000iV (Sysmex, Kobe, Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la dosis, no se observaron diferencias en la fracción de reticulocitos inmaduros ni en el recuento total de reticulocitos con ningún anticuerpo sometido a prueba, como se observa en la figura 21. Estos resultados sugieren que la mutación LALAPG no solo anula la función efectora del anticuerpo sino que también reduce la unión al complemento y el aclaramiento de reticulocitos mediado por el complemento que se observa incluso con una región estructural de anticuerpo sin función efectora (Couch et al. 2013). Esto es consecuente con otro informe según el cual la incorporación de la mutación LALA en una IgG1 humana puede limitar la unión al complemento (Hessell et al. *Nature* 449:101-104(2007)).

EJEMPLO 8: CREACIÓN DE VARIANTES BISPECÍFICAS DE FcRn^{HIGH}

Para incrementar la semivida de los anticuerpos biespecíficos y, de este modo, incrementar potencialmente la concentración del anticuerpo en el cerebro, se elaboraron variantes biespecíficas que contenían mutaciones en el dominio constante de IgG y específicamente en el dominio de unión del receptor Fc-neonatal (FcRn) (mutaciones FcRn^{HIGH}). El dominio de unión de FcRn se ha implicado en la transferencia maternofetal de anticuerpos. Véase Story et al., *J. Exp. Med.*, 180:2377-2381, 1994. Las sustituciones aminoacídicas en el dominio de unión de FcRn incrementan la afinidad del dominio constante por el FcRn, incrementando de este modo la semivida del anticuerpo.

Se ha descrito que las mutaciones del dominio de unión de FcRn M252Y, S254T y T256E (YTE) incrementan la unión a FcRn y, por tanto, incrementan la semivida de los anticuerpos. Véase la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 2003/0190311 y Dall'Acqua et al., *J. Biol. Chem.* 281:23514-23524 (2006). Adicionalmente, se ha descrito que las mutaciones del dominio de unión de FcRn N434A e Y436I (AI) también incrementan la unión a FcRn. Véase Yeung et al., *J. Immunol.* 182: 7663-7671 (2009). Se incorporaron las mutaciones YTE (M252Y/S254T/T256E) y AI (N434A/Y436I) en anticuerpos biespecíficos tanto anti-TfR52A/BACE1 como anti-TfR2/BACE1 que contenían IgG1 humana WT o mutaciones LALAPG o N297G sin función efectora. Además, se realizó la mutación FcRn^{HIGH} en el anticuerpo anti-gD hlgG1 como control. Se construyeron mutaciones usando

mutagénesis de Kunkel, se expresaron anticuerpos de forma transitoria en células CHO y se purificaron las proteínas usando cromatografía de proteína A seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Se midió la unión de los anticuerpos variantes FcRnHIGH a FcRn usando BIAcore. Se expresaron las proteínas FcRn humanas y de macaco cangrejero en CHO y se purificaron usando cromatografía de afinidad con IgG. Los datos se adquirieron en un instrumento BIAcore T200. Se activó un chip de sensor CM5 de la serie S (GE Healthcare, Cat. BR100530) con reactivos EDC y NHS de acuerdo con las instrucciones del proveedor, y se acopló un anticuerpo anti-Fab (kit de captura Human Fab, GE Health care Bio-science. AB SE-75184, upsala, Suecia) para lograr aproximadamente 10 000 unidades de respuesta (UR), seguido del bloqueo de los grupos que no reaccionaron con 1-metanolamina. Para las mediciones de afinidad, en primer lugar se inyectaron anticuerpos a un caudal de 10 µl/min para capturar aproximadamente 1000 UR en 3 cubetas de lectura (FC) diferentes, excepto FC1 (referencia), y, a continuación, se inyectaron diluciones en serie 1:2 de FcRn humano (o FcRn de macaco cangrejero) en tampón pH6 (fosfato de sodio 0,1 M), de bajo (1 nM) a alto (25 µM) (caudal: 30 µl/min) uno después del otro en el mismo ciclo sin ninguna regeneración entre inyecciones. Se registraron los sensogramas y se sometieron a la resta de la referencia y el tampón antes de la evaluación usando el programa informático de evaluación BIACORE® T200 (versión 2.0). Se determinaron las afinidades analizando el nivel de unión en estado de equilibrio en base a un modelo de unión 1:1. Las afinidades de unión para las variantes LALAPG, N297G, LALAPG.YTE y LALAPG.AI de anti-TfR52A/BACE1 se muestran en la tabla 11 a continuación. Los datos muestran que las variantes de FcRn-HIGH potencian la afinidad endosómica (pH 6) tanto por el FcRn humano como por el de macaco cangrejero.

TABLA 11

Anticuerpo	Función efectora	FcRn alto	FcRn humano KD a pH6 (uM)	FcRn de macaco cangr. KD a pH6 (uM)
Anti-TfR.52A/BACE1.hlgG1	WT	WT		
Anti-TfR.52A/BACE1.hlgG1.N297G	N297G	WT	1,3	2,1
Anti-TfR.52A/BACE1.hlgG1.LALAPG	LALAPG	WT	0,8	1,2
Anti-TfR.52A/BACE1.hlgG1.N297G.YTE	N297G	YTE		
Anti-TfR.52A/BACE1.hlgG1.LALAPG.YTE	LALAPG	YTE	0,2	0,2
Anti-TfR.52A/BACE1.hlgG1.N297G.AI	N297G	N434A/Y436I		
Anti-TfR.52A/BACE1.hlgLALAPG.AI	LALAPG	N434A/Y436I	0,6	0,4
Anti-TfR.52A/BACE1.hlgG1.N297G.A	N297G	N434A		
Anti-TfR2/BACE1.hlgG1.N297G	N297G	WT	1,7	2,1
Anti-TfR2/BACE1.hlgG1.LALAPG	LALAPG	WT	1,1	1,2
Anti-TfR2/BACE1.hlgG1.LALAPG.YTE	LALAPG	YTE	0,3	0,2
Anti-gD.hlgG1	WT	WT	0,7	0,9
Anti-gD.hlgG1.YTE	WT	YTE		
Anti-gD.hlgG1.AI	WT	N434A/Y436I	0,3	0,4
Anti-gD.hlgG1.A	WT	N434A	0,1	0,7

Se someterán a prueba variantes seleccionadas de FcRnHIGH en macacos cangrejeros para determinar si la potenciación de la afinidad de FcRn puede incrementar, mejorar las propiedades farmacocinéticas y/o incrementar la exposición cerebral de los anticuerpos anti-TfR/BACE1.

Para evaluar la seguridad de las mutaciones sin función efectora y FcRnHIGH, se administraron determinados anticuerpos biespecíficos a ratones con inserción génica del receptor de transferrina humano que expresan el receptor de transferrina humano. Los ratones con inserción génica de huTfR se generaron como sigue. La construcción para seleccionar como diana ADNc de TFRC humano en el locus C57BL/6 Tfrc en células ES se realizó usando una combinación de recombinación (Warming et al. Molecular and Cellular Biology vol. 26 (18) págs. 6913-22 2006; Liu et al Genome Research (2003) vol.13 (3) págs. 476-84) y técnicas estándar de clonación molecular.

En resumen, se usó un casete (ADNc de TFRC humano, SV40 pA y frt-PGK-em7-Neo-BGHpA-frt) flanqueado por homologías cortas con el gen Tfrc de ratón para modificar un Tfrc C57BL/6J BAC (colección de RP23 BAC) por recombinación. Se insertó el casete de ADNc de TFRC humano en el ATG endógeno y se eliminó el resto del exón 2 de Tfrc más el comienzo del intrón 2. A continuación, se recuperó la región seleccionada en el BAC en pBlight-TK (Warming et al. Molecular and Cellular Biology vol. 26 (18) págs. 6913-22 2006) junto con secuencias de Tfrc

genómicas flanqueantes como brazos de homología para la selección como diana de células ES. Específicamente, el brazo de homología 5' de 2950 pb corresponde a (ensamblaje NCBI37/mm9): cr. 16:32,610,333-32,613,282 y el brazo de homología 3' de 2599 pb corresponde a cr.16:32,613,320-32,615,918. Se confirmó el vector final por secuenciación de ADN.

Se linealizó el vector Tfrc/TFRC KI con NotI y se seleccionaron como diana las células ES C57BL/6N C2 usando procedimientos estándar (selección positiva para G418 y negativa para ganciclovir). Se identificaron los clones positivos por PCR y análisis taqman, y se confirmaron por secuenciación del locus modificado. Se transfectaron células ES seleccionadas correctamente con un plásmido Flpe para retirar Neo y, a continuación, se inyectaron células ES en blastocistos usando técnicas estándar. Se obtuvo la transmisión por línea germinal después de cruzar las quimeras resultantes con hembras C57BL/6N.

Específicamente, se administraron los anticuerpos enumerados en la tabla a continuación a ratones con inserción génica de huTfR en una dosis única de 50 mg/kg y 24 horas después se les extrajo sangre y reticulocitos, hulgl, N297G.

TABLA 12

Anticuerpo	Isotipo	Número de ratones
anti-gD	hulgl, N297G	6
anti-TfR ^{52A} /BACE1	hulglG1, N297G	6
anti-TfR ^{52A} /BACE1	hulglG1, LALAPG	6
anti-TfR ^{52A} /BACE1	hulglG1, LALAPG/YTE	6
anti-TfR ^{52A} /BACE1	hulglG1, LALAPG/AI	6

Después de la administración de los anticuerpos anti-TfR^{52A}/BACE1 LALAPG, LALAPG/YTE o LALAPG/AI (grupos 3-5 en la tabla 12), los ratones con inserción génica de TfR humano no presentaron síntomas clínicos ni pérdida de reticulocitos (figura 22) como se observa previamente usando anticuerpos anti-TfR con función efectora completa (Couch et al. 2013). Estos resultados indican que la incorporación de la mutación LALAPG en la región estructural de IgG1 humana también anula la función efectora y sugiere además que la adición de las mutaciones YTE o bien AI FcRnHIGH no interfiere en las propiedades deseadas de las mutaciones LALAPG para dejar el anticuerpo sin función efectora.

También se llevaron a cabo ensayos de ADCC para confirmar el estado sin función efectora de las combinaciones de mutaciones LALAPG, LALAPG/YTE y LALAPG/AI en una línea celular de origen humano. Como previamente, se usó la línea celular de eritroleucemia humana (HEL, ATCC) como células diana con PBMC de donantes humanos sanos que portaban el genotipo F/V158 o bien el genotipo FcγRIIIA V/V158. El genotipo V/V158 también se incluyó en este ensayo debido a la asociación conocida con una actividad incrementada de ADCC mediada por linfocitos NK, así como la capacidad de unirse a anticuerpos IgG4 (Bowles y Weiner, 2005; Bruhns et al. 2008). Se contaron las células y se determinó la viabilidad por Vi-CELL® (Beckman Coulter; Fullerton, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se aislaron las PBMC por centrifugación en gradiente de densidad usando tubos de separación de sangre Uni-Sep™ (Accurate Chemical & Scientific Corp.; Westbury, NY). Se sembraron células diana en 50 µl de medio de ensayo (RPMI-1640 con BSA al 1 % y 100 unidades/ml de penicilina y estreptomycin) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos a 4 x 104/pocillo. Se añadieron diluciones en serie de anticuerpos de prueba y de control (50 µl/pocillo) a las placas que contenían las células diana, seguido de incubación a 37 °C con 5 % de CO2 durante 30 minutos para permitir la opsonización. Las concentraciones finales de anticuerpos variaron de 0,0051 a 10 000 ng/ml después de diluciones en serie 1:5 para un total de 10 puntos de datos. Después de la incubación, se añadieron a cada pocillo 1,0 x 106 células efectoras PBMC en 100 µl de medio de ensayo para dar una proporción de 25:1 de células efectoras:diana, y se incubaron las placas durante 4 horas adicionales. Se centrifugaron las placas al final de la incubación y se sometieron a prueba los sobrenadantes para determinar la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) usando un CytotoxicityDetection Kit™ (Roche Applied Science; Indianápolis, IN). Se añadió la mezcla de reacción de LDH a los sobrenadantes y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación constante. Se terminó la reacción con H3PO4 1 M y se midió la absorbancia a 490 nm (se restó el fondo, medido a 650 nm, para cada pocillo) usando un lector de microplacas SpectraMax Plus. La absorbancia de los pocillos que contenían solo las células diana sirvió como control para el fondo (control bajo), mientras que los pocillos que contenían células diana lisadas con Triton-X100 proporcionaron la señal máxima disponible (control alto). Se midió la citotoxicidad celular independiente de

anticuerpos (AICC) en pocillos que contenían células diana y efectoras sin la adición de anticuerpos. El alcance de la ADCC específica se calculó como sigue:

$$\% \text{ ADCC} = 100 \times \frac{A_{490} (\text{Muestra}) - A_{490} (\text{AICC})}{A_{490} (\text{Control alto}) - A_{490} (\text{Control bajo})}$$

5

Se trazó la curva de los valores de ADCC de las diluciones de la muestra frente a la concentración de anticuerpos y se ajustaron las curvas de dosis-respuesta a un modelo de cuatro parámetros usando SoftMax Pro.

10

Los resultados del ensayo de ADCC se muestran en la figura 23. Como se esperaba, el anticuerpo anti-TfR humano positivo para función efectora (anti-TfR1/gD IgG1 WT) provocó una actividad de ADCC significativa en las células HEL. Por el contrario, las variantes del anticuerpo anti-TfR52A/BACE1 que contienen mutaciones LALAPG, LALAPG/YTE, o LALAPG/AI no presentaron ninguna actividad de ADCC en células HEL, similar al anticuerpo anti-TfR52A/gD N297G de control negativo.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor de transferrina humano (TfR) y TfR de primate para su uso en tratamiento, en el que el anticuerpo transporta uno o más compuestos a través de la barrera hematoencefálica (BHE), en el que el anticuerpo no inhibe la unión de transferrina a TfR, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 153 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 105.
2. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
4. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está acoplado a un compuesto terapéutico.
5. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto terapéutico forma opcionalmente una porción del anticuerpo multiespecífico.
6. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a TfR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral, en el que el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), tau, apolipoproteína E (ApoE), 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 amiloidea (PPA), receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) y caspasa 6.
7. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1.
8. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta.
9. El anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el compuesto terapéutico es un fármaco para trastornos neurológicos.

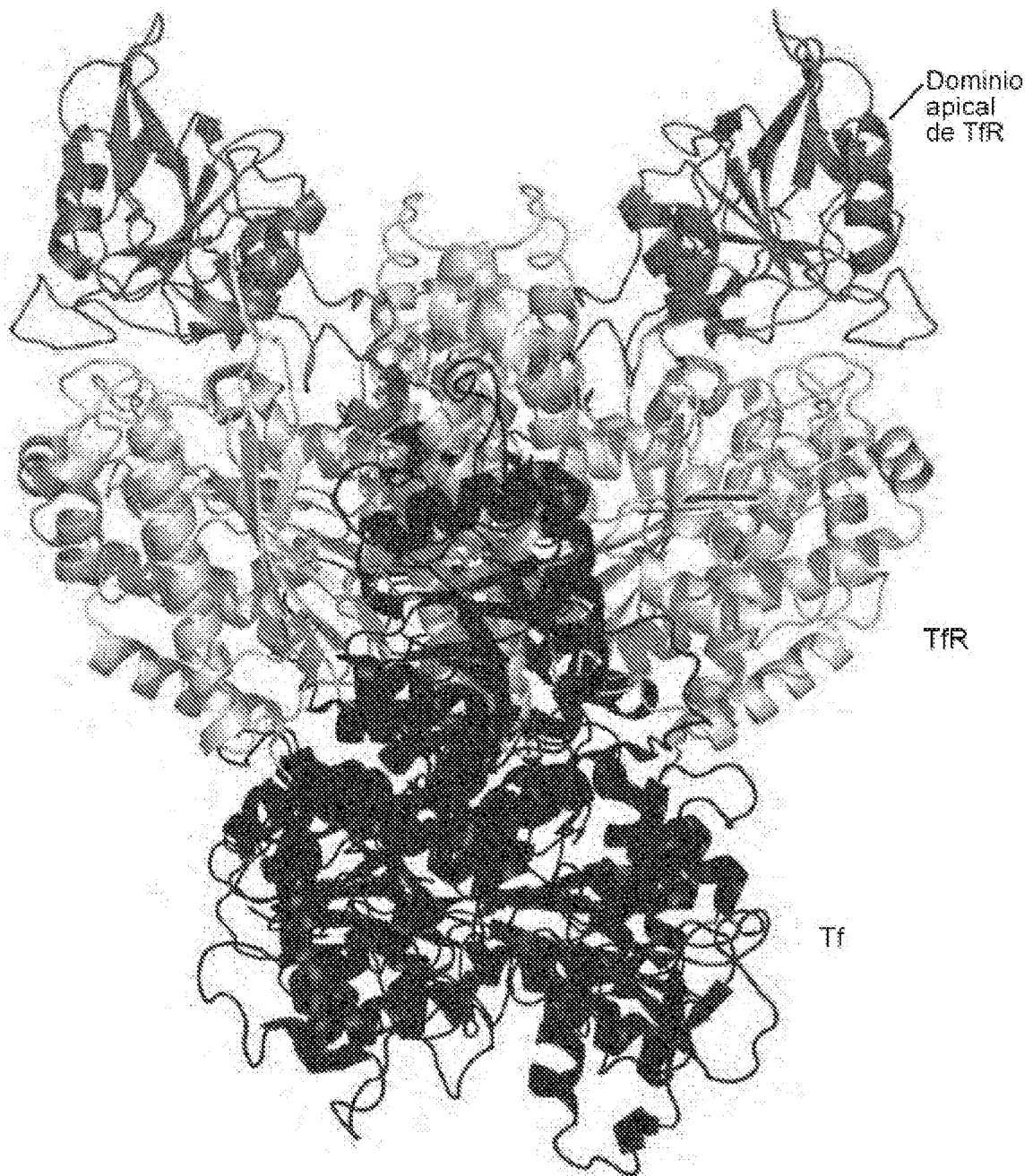
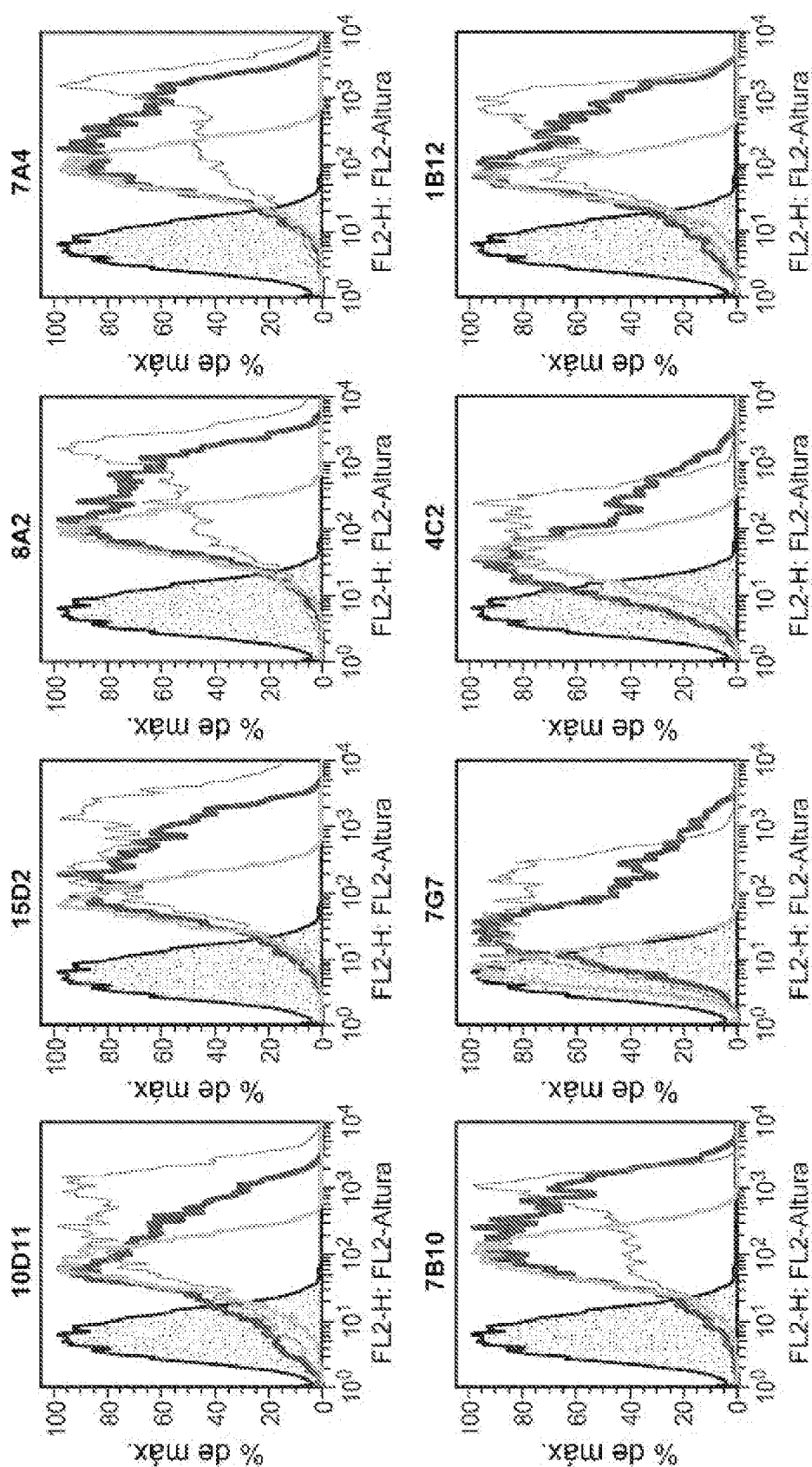
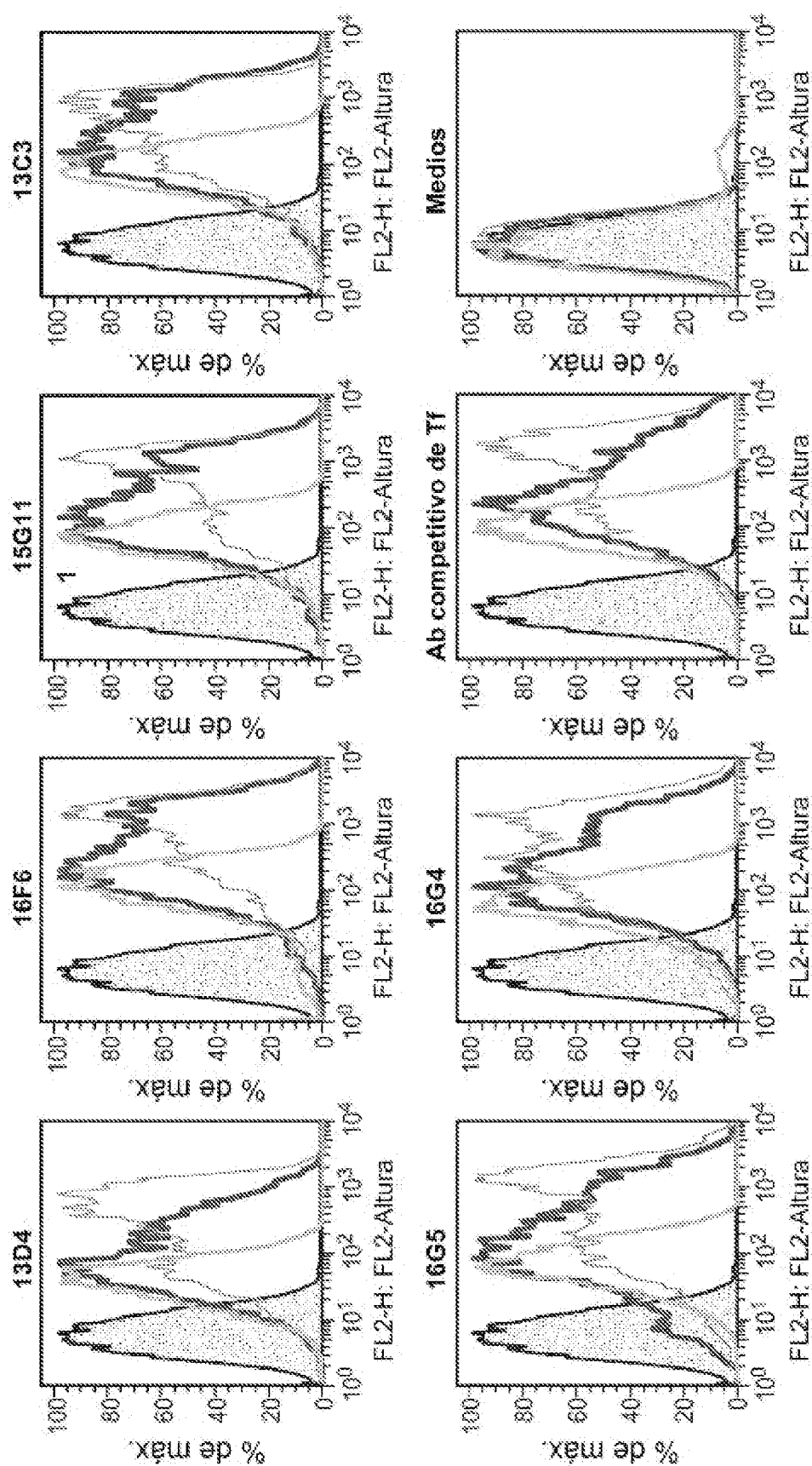


FIG. 1



(Relleno de negro) = 2 ° Ab-PE
 (Gris oscuro) = 293 transfectadas con huTFR
 (Gris claro) = 293 transfectadas con TFR de mac. cangr.

FIG. 2A



{Releño de negro) = 2.º Ab-PE
{Gris oscuro) = 293 transfecidas con huTfR
{Gris fino) = 293 transfecidas con TfR de mac. cangr.
{Gris medio) = 293

FIG. 2B

Caracterización de hibridomas anti-TfR con reacción cruzada de humano y macaco cangrejero que no compiten por la unión de Tf a TfR

Blancos de Hibridoma o IgG química														
	Compite con aglutinante del complejo apical	Unión por ELISA de huTFR	Unión por ELISA a TFR de macazo cangrejero	HuTFR						TFR de mac. cangr.				Proporción de KD mac. cangrejo
				Ka	Kd	Kd	KD	Ka	Kd	Ka	Kd			
Clase I	7A4	+++	+++	+++	2.11E+05	4.34E-04	2.06E-10	1.06E+08	8.83E-04	8.27E-10	3.04			
	8A2	+++	+++	+++	1.22E+05	2.17E-04	1.79E-10	7.81E+05	7.16E-04	8.04E-10	5.06			
	7A4 HC/8A2 LC	+++	+++	+++	3.01E+06	3.35E-04	1.12E-10	1.33E+08	1.22E-03	9.25E-10	8.29			
	1502	+++	+++	+++										
	10D11	+++	+++	+++	1.59E+05	3.44E-04	2.06E-09	8.46E+04	5.81E-03	8.88E-08	43.32			
Clase II	7B10	+++	+++	+++										
	15G11	+++	+++	+++	8.90E+05	9.83E-04	9.92E-10	1.29E+06	3.35E-03	2.60E-09	2.62			
	13C3	+++	+++	+++										
	16G5	+++	+++	+++										
	16G4	+++	+++	+++	4.77E+05	1.52E-03	3.46E-09	2.33E+05	5.23E-03	2.24E-08	8.59			
Clase III	16F6	+++	+++	+++	1.36 E+05	2.81E-04	2.07E-08	1.23E+06	9.13E-04	7.45E-08	3.6			
Clase IV	7G7	-	+++	+++	1.33E+05	8.08E-03	4.57E-08	4.53E+04	1.21E-02	2.62E-07	5.79E			
	4C2	-	+++	+++										
	1B12	-	+++	++	1.36E+05	2.76E-04	2.03E-09	1.34E+05	5.80E-03	4.34E-08	21.35			
	13D4	-	+++	++	9.99E+04	9.49E-04	9.50E-09	7.00E+04	5.98E-04	8.47E-09	8.89			

FIG. 2C

Región variable de la cadena ligera

Número de Kabat	CDR L1 - Contacto																																									
	CDR L1 - Chothia																																									
	CDR L1 - Kabat																																									
7A4	D	I	V	E	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	E	S	V	D	D	Y	C	N	S	F	K	H	W	Y	Q	Q
8A2	D	I	V	E	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	E	S	V	D	D	Y	C	N	S	F	K	H	W	Y	Q	Q
15D2	D	I	V	E	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	E	S	V	D	D	Y	C	N	S	F	K	H	W	Y	Q	Q
10D11	D	I	V	E	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	E	S	V	D	D	Y	C	N	S	F	K	H	W	Y	Q	Q
7B10	D	I	V	E	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	E	S	V	D	D	Y	C	N	S	F	K	H	W	Y	Q	Q

Número de Kabat	CDR L2 - Contacto																																									
	CDR L2 - Chothia																																									
	CDR L2 - Kabat																																									
7A4	K	P	C	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	N	I	E	S	C	I	P	A	R	R	E	S	C	C	S	K	T	D	F	T	L	T	I	K	P	V	E	A
9A2	K	P	C	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	N	I	E	S	C	I	P	A	R	R	E	S	C	C	S	K	T	D	F	T	L	T	I	K	P	V	E	A
15D2	K	P	C	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	N	I	E	S	C	I	P	A	R	R	E	S	C	C	S	K	T	D	F	T	L	T	I	K	P	V	E	A
10D11	K	P	C	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	N	I	E	S	C	I	P	A	R	R	E	S	C	C	S	K	T	D	F	T	L	T	I	K	P	V	E	A
7B10	K	P	C	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	N	I	E	S	C	I	P	A	R	R	E	S	C	C	S	K	T	D	F	T	L	T	I	K	P	V	E	A

Número de Kabat	CDR L3 - Contacto																																						SEQ ID NO: 4	
	CDR L3 - Chothia																																							SEQ ID NO: 5
	CDR L3 - Kabat																																							
7A4	D	C	V	A	T	Y	C	Q	Q	C	N	E	A	P	P	T	P	C	C	Q	T	K	L	L	E	E	I	I	K	SEQ ID NO: 4										
8A2	D	C	V	A	T	Y	C	Q	Q	C	N	E	A	P	P	T	P	C	C	Q	T	K	L	L	E	E	I	I	K	SEQ ID NO: 5										
15D2	D	C	V	A	T	Y	C	Q	Q	C	N	E	A	P	P	T	P	C	C	Q	T	K	L	L	E	E	I	I	K	SEQ ID NO: 5										
10D11	D	C	V	A	T	Y	C	Q	Q	C	N	E	A	P	P	T	P	C	C	Q	T	K	L	L	E	E	I	I	K	SEQ ID NO: 6										
7B10	D	C	V	A	T	Y	C	Q	Q	C	N	E	A	P	P	T	P	C	C	Q	T	K	L	L	E	E	I	I	K	SEQ ID NO: 4										

FIG. 3A-1

Región variable de la cadena pesada

Número de Kabat	CDR H2 - Contacto										CDR H1 - Choltia										CDR H1 - Contacto																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
7A4	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	2	E	L	V	R	P	G	V	S	V	K	I	S	C	S	G	S	G	V	T	F	F	D	V	A	K	H	H	V	K	Q	S	H	A
8A2	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	2	E	L	V	R	P	G	V	S	V	K	I	S	C	K	C	S	G	V	T	F	F	D	V	C	K	H	H	V	K	Q	S	H	A
15D2	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	2	E	L	V	R	P	G	V	S	V	K	I	S	C	S	G	S	G	V	T	F	F	D	V	A	K	H	H	V	K	Q	S	H	A
10D11	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	2	E	L	V	R	P	G	V	S	V	K	I	S	C	K	C	S	G	V	T	F	F	D	V	C	K	H	H	V	K	Q	S	H	A
7B10	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	2	E	L	V	R	P	G	V	S	V	K	I	S	C	K	C	S	G	V	T	F	F	D	V	A	K	H	H	V	K	Q	S	H	A

Número de Kabat	CDR H2 - Contacio										CDR H2 - Cholnia										CDR H2 - Kabat																					
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83a	
7A4	X	S	L	E	W	I	G	G	I	S	T	Y	F	C	R	E	N	Y	K	Q	X	F	K	G	K	A	T	M	E	V	D	X	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	A
8A2	X	S	L	E	W	I	G	G	I	S	P	Y	F	C	R	E	N	Y	K	Q	X	F	K	G	K	A	T	M	E	V	D	X	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	A
15D2	X	S	L	E	W	I	G	G	I	S	F	Y	F	C	R	E	N	Y	K	Q	X	F	K	G	K	A	T	M	E	V	D	X	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	A
10D11	X	S	L	E	W	I	G	G	I	S	F	Y	F	C	R	E	N	Y	K	Q	X	F	K	G	K	A	T	M	E	V	D	X	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	A
7B10	X	S	L	E	W	I	G	G	I	S	T	Y	F	C	R	E	N	Y	K	Q	X	F	K	G	K	A	T	M	E	V	D	X	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	A

CDR H3 - Contacto																																					
CDR H3 - Choltia																																					
CDR H3 - Kabat																																					
Número de Kabat	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113		
7A4	R	L	T	S	E	D	S	A	L	V	Y	C	A	R	G	L	S	C	K	Y	V	W	D	Y	K	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 7	
8A2	R	L	T	S	E	D	S	A	L	V	Y	C	A	R	G	L	S	C	K	Y	V	W	D	Y	K	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 8	
15D2	R	L	T	S	E	D	S	A	L	V	Y	C	A	R	G	L	S	C	K	Y	V	W	D	Y	K	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 9	
10D11	R	L	T	S	E	D	S	A	L	V	Y	C	A	R	G	L	S	C	K	Y	V	W	D	Y	K	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 10	
7B10	R	L	T	S	E	D	S	A	L	V	Y	C	A	R	G	L	S	C	K	Y	V	W	D	Y	K	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 7	

FIG. 3A-2

Región variable de la cadena ligera

Número de Kabat	CDR L1 - Contacto																																									
	CDR L1 - Chotnia																																									
	CDR L1 - Kabat																																									
Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
15G11	D	I	Q	N	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	E	Y	S	K	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	K	
16G5	D	I	Q	E	T	Q	T	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	E	Y	S	K	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	K	
13G3	D	I	Q	N	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	E	Y	S	K	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	K	
16G4	D	I	Q	N	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	E	Y	S	K	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	K	

Número de Kabat	CDR L2 - Contacto																																									
	CDR L2 - Chotlia																																									
	CDR L2 - Kabat																																									
15G11	S	P	Q	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	K	D	F	G
16G5	S	P	Q	L	L	V	Y	A	A	T	D	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	K	D	F	G
13G3	S	P	Q	L	L	V	Y	A	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	K	D	F	G
16G4	S	P	Q	L	L	V	Y	A	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	K	D	F	G

CDR L3 - Contacto																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
CDR L3 - Chothia																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
CDR L3 - Kabat																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Número de Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				

FIG. 3B-1

Región variable de la cadena pesada

Número de Kabat	CDR H1 - Contacto																																							
	CDR H1 - Chothia																																							
15G11	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	E	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	S	Y	K	H	W	V	K	Q	R	P	G
16G5	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	E	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	S	Y	K	H	W	V	K	Q	R	P	G
13G3	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	E	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	S	Y	K	H	W	V	K	Q	R	P	G
16G4	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	E	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	S	Y	K	H	W	V	K	Q	R	P	G

Numero de Kabat	CDR H2 - Contacto																																									
	CDR H2 - Chothia																																									
	CDR H2 - Kabat																																									
15G11	Q	G	L	E	N	I	C	E	I	N	P	T	N	C	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	N	Q	L	S
16G5	Q	G	L	E	N	I	C	E	I	N	P	T	N	C	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	N	Q	L	S
13G3	Q	G	L	E	N	I	C	E	I	N	P	T	N	C	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	N	Q	L	S
16G4	Q	G	L	E	N	I	C	E	I	N	P	T	N	C	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	N	Q	L	S

Número de Kabat	CDR H3 - Contacto																																		
	CDR H3 - Chothia																																		
15G11	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	E	Y	P	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 15
16G5	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	E	Y	P	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 16
13G3	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	E	Y	P	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 17
16G4	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	E	Y	P	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 18

FIG. 3B-2

Región variable de la cadena ligera

		CDR L1 - Contacto	
		CDR L1 - Chothia	CDR L1 - Kabat
Número de Kabat	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42		
16F6	D V Q I T Q S P S Y L T A S P G E T I T I N C R A S K S I S E Y I A W Y Q R K P G K		
		CDR L2 - Contacto	
		CDR L2 - Chothia	CDR L2 - Kabat
Número de Kabat	43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84		
16F6	T N K L L I Y S G S T L Q S Q I P S R P S G S G S G S G T D P T L T I S N I E P E D P A		
		CDR L3 - Contacto	
		CDR L3 - Chothia	CDR L3 - Kabat
Número de Kabat	85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107		
16F6	N Y Y C Q Q Q E H E Y P M T P Q G G T X X L E E I K SEQ ID NO: 19		

FIG. 3C-1

Región variable de la cadena pesada

		CDR H1 - Contacto	
		CDR H1 - Chothia	
		CDR H1 - Kabat	
Número de Kabat	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 35a 36 37 38 39 40 41		
16F6	D V Q L Q R S Q P C L V R C L V R P S Q S L S L T C T V T G N S I T S E Y A W N W I R Q F P		
		CDR H2 - Contacto	
		CDR H2 - Chothia	
		CDR H2 - Kabat	
Número de Kabat	42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 82a		
16F6	C N R L E W K G Y I S Y S C T T S Y N P S L K S R I S I T R D T S S X K Q L F L Q L N		
		CDR H3 - Contacto	
		CDR H3 - Chothia	
		CDR H3 - Kabat	
Número de Kabat	82b 82c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 100a 100b 100c 100d 100e 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113		
16F6	S V T T E D T A T Y F C A R Y C Y G N P A T R R Y F D V W G A G T T Y T Y S S		
		SEQ ID NO: 20	

FIG. 3C-2

Región variable de la cadena ligera

CDR L1 - Contacto																																										
CDR L1 - Chothia																																										
CDR L1 - Kabat																																										
Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
7G7	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	R	Q	S	V	S	T	S	S	Y	S	F	N	E	W	Y	R	Q	
4C2	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	R	Q	S	V	S	T	S	S	Y	S	F	N	E	W	Y	R	Q	
1B12	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	R	Q	S	V	S	T	S	S	Y	S	F	N	E	W	Y	R	Q	
13D4	Q	I	Q	N	T	Q	T	E	S	Q	L	S	A	S	L	Q	D	R	V	T	I	N	C	R	A	C	Q

CDR L2 - Contacto																																	
CDR L2 - Chothia																																	
CDR L2 - Kabat																																	

Número de	Kabat	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	7G7	X	A	Q	P	R	X	L	I	X	Y	A	S	I	Q	E	E	Q	V	P	A	R	T	S	Q	S	C	G	C	G	C	T	D	T	L	N	I	L	P	V	E	E	
	4C2	X	A	Q	P	R	X	L	I	X	Y	A	S	I	Q	E	E	Q	V	P	A	R	T	S	Q	S	C	G	C	G	C	T	D	T	L	N	I	L	P	V	E	E	
	1B12	X	P	G	S	P	R	L	W	I	Y	S	T	S	N	L	A	S	C	V	P	A	R	T	S	Q	S	C	G	C	T	S	Y	S	L	I	S	S	M	E	E	A	
	13D4	X	P	D	G	T	V	K	L	I	Y	T	S	R	L	E	S	C	V	P	S	R	T	S	Q	S	C	G	C	G	T	D	Y	S	E	T	I	T	K	L	E	Q	

CDR L3 - Contacto																																	
CDR L3 - Chothia																																	
CDR L3 - Kabat																																	

Número de Kabat	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												</
-----------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

SEQ ID NO: 21
SEQ ID NO: 22
SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 24

FIG. 3D-1

Número de Kabat	CDR H2 - Contacto																				CDR H2 - Chothia																				CDR H2 - Kabat																				Número de Kabat	CDR H3 - Contacto																				CDR H3 - Chothia																				CDR H3 - Kabat																				Número de Kabat	SEQ ID NO																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83a	83b	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112			113																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
7G7	Q	V	Q	L	Q	Q	P	Q	S	E	L	V	R	P	G	A	S	V	R	L	S	C	X	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	E	W	V	R	Q	X	E	G	7G7	Q	Q	L	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S	G	S	T	X	Y	D	N	R	F	X	S	X	C	T	L	T	V	D	T	S	G	S	T	A	Y	M	E	L	S	7G7	Q	Q	L	E	W	I	Q	N	I	Y	P	Q	S</

FIG. 3D-2

Humanización de 15G11 para generar hu15G11.v5

Cadena ligera, kappa: Anticuerpo de ratón alineado con líneas germinales humanas

CDR L1																																									
Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36					
IGKV1-NL1*01	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	Z	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	S	N	S	L	A	N	Y
15G11	D	I	Q	N	T	Q	S	P	A	S	Z	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	N	Y
hu15G11.v5	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	Z	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	N	Y

CDR L2																																						
Número de Kabat	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71			
IGKV1-NL1*01	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	L	Y	A	A	S	R	E	E	S	G	V	P	S	R	T	S	G	S	G	T	D	Y	
15G11	Q	Q	K	Q	G	K	S	P	Q	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	T	S	G	S	G	T	Q	Y	
hu15G11.v5	Q	Q	K	P	G	K	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	T	S	G	S	G	T	D	Y	

CDR L3																																							
Número de Kabat	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	NO.		
IGKV1-NL1*01	T	L	T	I	S	L	Q	P	E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	Y	Y	S	T	P	.	.	.	Y	T	I	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	103	
15G11	S	L	K	T	N	S	L	Q	S	D	P	Q	T	Y	Y	C	Q	S	P	N	G	T	P	.	.	.	D	T	G	K	C	T	K	L	E	K	104		
hu15G11.v5	T	L	T	I	S	L	Q	P	E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	T	P	N	G	T	P	.	.	.	L	T	T	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	105

FIG. 4A-1

Humanización de 15G11 para generar Hu15G11.v5

Cadena pesada: Anticuerpo de ratón alineado con líneas germinales humanas

 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			CDR H1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
--	--	--	--------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--
--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--
--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--
--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--
--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

Humanización de 7A4/8A2 para generar hu7A4.v15

Cadena ligera, kappa: Anticuerpo de ratón alineado con líneas germinales humanas

[illegible]

	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	CDR L2										59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
Número de Kabat	Q	Q	X	P	G	Q	P	P	X	L	L	L	Y	R	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F		
IGKV4-1701	Q	Q	X	P	G	Q	P	P	X	L	L	L	Y	R	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F		
8A27TA4	Q	Q	X	P	G	Q	P	P	X	L	L	L	Y	R	A	S	N	L	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	R	F	D	F		
hu7A4.v15	Q	Q	X	P	G	Q	P	P	X	L	L	L	Y	R	A	S	N	L	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	R	F	D	F		

CDRL3		SEQ ID
Número de Kabat	72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95	NO: 109 110 111
IGKV4-1701	T L T I S S L Q A E D V A V Y V Y C Q Q Q Y Y S T P	196 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
8A27A4	T L T I S S L Q A E D V A V Y V Y C Q Q Q S H E G P	197 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
hu7A4.v15	T L T I S S L Q A E D V A V Y V Y C Q Q Q S H E A P	198 99 100 101 102 103 104 105 106 107

FIG. 4B-1

Cadena pesada: Anticuerpo de ratón alineado con líneas germinales humanas

FIG. 4B-2

Cadena ligera, kappa: Anticuerpo de ratón alineado con K4H1

Número de	Kabat	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	CDRL3	SEQ ID
K4H1	T L T	I S S	L Q A	E D V	A V Y	Y C Q	Q Y Y	S T F	F T F	G G	G	T K	V E I	K	115					
7G7	T L S	I L P	V Z E	E D I	A T Y	Y C Q	E T W	E I P	F T F	G S	G	T K	E I K	116						
hu7G7.v1	T L T	I S S	L Q A	E D V	A V Y	Y C Q	E T W	E I P	F T F	G G	G	T K	V E I	K	117					

FIG. 4C-1

Cadena pesada: Anticuerpo de ratón alineado con K4411

CDR H3																			SEQ ID																																		
Número de Kápat																			85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B		101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	NO:		
KAH1																			E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	E	E	D	Y	W	G	Q	G	T	L	Y	T	Y	S	S	118
7G7																			E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	E	P	Y	Y	W	G	Q	G	T	L	Y	T	Y	S	S	119
hu7G7.v1																			E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	E	P	Y	Y	W	G	Q	G	T	L	Y	T	Y	S	S	120

FIG. 4C-2

Humanización de 16F6 para generar hu16F6.v4

Cadena ligera, kappa: Anticuerpo de ratón alineado con líneas germinales humanas

CDRL1																																								
Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36				
IGKV4-9*01	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	F	L	S	A	S	V	Q	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	G	I	S	S	L	A	W	Y	
16F6	D	V	Q	I	T	Q	S	P	S	Y	L	L	A	S	P	G	E	T	I	T	I	N	C	R	A	S	N	S	I	S	K	Y	L	A	W	Y
hu16F6.v4	D	I	Q	K	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	Q	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	E	S	I	S	K	Y	L	A	W	Y

CDRL2																																							
Número de Kabat	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71				
IGKV4-9*01	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F
16F6	Q	E	E	G	K	T	N	K	L	L	I	Y	Y	S	G	S	T	L	Q	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F
hu16F6.v4	Q	Q	K	P	G	K	T	N	K	L	L	E	Y	S	G	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y

CDRL3																																							
Número de Kabat	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	NO:		
IGKV4-9*01	T	L	T	I	S	L	L	Q	P	E	D	P	A	T	Y	Y	C	Q	Q	L	N	S	Y	P	121
16F6	T	L	T	I	S	N	L	Q	P	E	D	P	A	N	Y	Y	C	Q	Q	H	N	S	Y	P	122	
hu16F6.v4	T	L	T	I	S	L	Q	P	E	D	P	A	T	Y	Y	C	Q	Q	H	N	S	Y	P	123	

FIG. 4D-1

Humanización de 16F6 para generar hu16F6.v4

Cadena pesada: Anticuerpo de ratón alineado con líneas germinales humanas

Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	36	37	38	39	40	41	42	43	44		
IGHV4-59*01	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	E	P	S	E	T	L	S	E	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	S	Y	Y	W	S	.	.	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	
16F6	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	E	P	S	Q	S	L	S	L	T	C	T	V	T	G	N	S	I	T	S	E	Y	A	K	K	.	.	W	I	R	Q	P	P	G	N	K
hu16F6.v4	E	V	Q	L	V	E	S	G	P	G	L	V	E	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	N	S	I	T	S	E	Y	A	K	K	.	.	W	I	R	Q	P	P	G	K	G

CDR H1

Número de Kabat	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84		
IGHV4-59*01	L	E	W	I	G	Y	I	Y	.	.	Y	S	C	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	K	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A
16F6	L	E	W	K	G	Y	I	G	.	.	Y	S	C	T	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	I	S	I	T	R	D	T	S	K	K	Q	L	F	L	Q	L	N	S	V	T	A
hu16F6.v4	L	E	W	I	G	Y	I	S	.	.	Y	S	C	T	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	K	R	T	S	K	K	Q	L	S	L	K	L	S	S	V	T	A

CDR H2

Número de Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	NO		
IGHV4-59*01	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	X	D	V	W	G	K	G	T	T	V	T	V	S	S	124
16F6	E	D	T	A	T	T	T	C	A	R	P	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S	125
hu16F6.v4	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	P	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S	126

CDR H3

Número de Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	SEQ ID NO		
IGHV4-59*01	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	X	D	V	W	G	K	G	T	T	V	T	V	S	S	124
16F6	E	D	T	A	T	T	T	C	A	R	P	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S	125
hu16F6.v4	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	P	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S	126

FIG. 4D-2

FIG. 4E

FIG. 4E-1
FIG. 4E-2

FIG. 4E-1

Variantes de humanización 15G11, 7A4 y 16F6

LC	HC							HuTIR			TIR de mac. cangr.			Proporción mac. cangr/hu
	43	48	48	67	69	71	73	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
mu15G11	S	V	I	A	L	V	K	8,900E+05	8,825E-04	9,916E-10	1,288E+06	3,349E-03	2,600E-09	2,6
hu15G11.v1	A	L	M	V	I	R	T	6,240E+05	3,194E-03	5,119E-09	8,571E+05	8,670E-03	1,012E-08	2,0
hu15G11.v2	A	L	M	V	I	V	T	3,520E+06	3,290E-03	9,347E-09	4,564E+05	8,021E-03	1,761E-08	1,9
hu15G11.v3	S	V	M	V	I	R	T	5,703E+05	2,347E-03	4,115E-09	8,044E+05	4,292E-03	5,336E-09	1,3
hu15G11.v4	S	V	M	V	I	V	T	4,773E+05	1,855E-03	3,886E-09	5,732E+05	4,033E-03	7,036E-09	1,8
hu15G11.v5	S	V	I	A	L	V	K	6,46E+05	0,00215	3,33E-09	5,43E+05	0,00641	1,18E-08	3,5

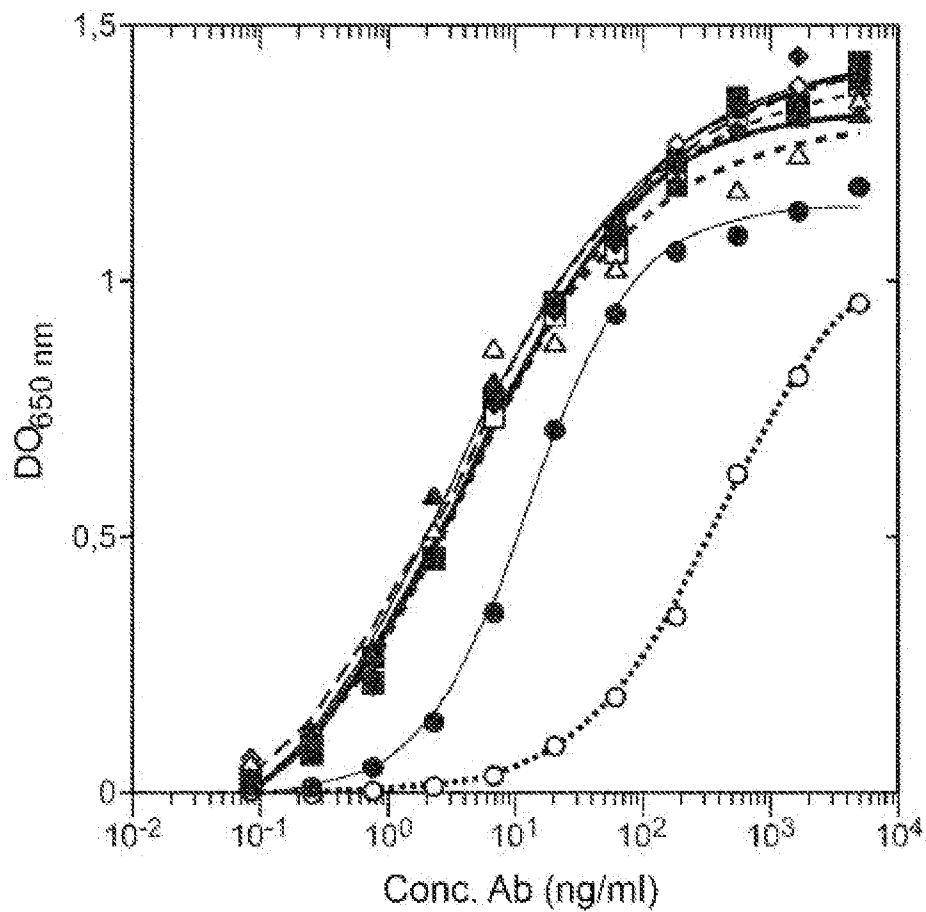
LC	HC							HuTIR			TIR de mac. cangr.			Proporción mac. cangr/hu
	27d	58	58	94	24	71		Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
ch7A4	D	I	R	A	G	V		2,11E+06	4,34E-04	2,08E-10	1,06E+06	6,63E-04	6,27E-10	3,04
ch7A4.8A2	S	I	R	G	G	V		3,007E+06	3,353E-04	1,115E-10	1,315E+06	1,216E-03	9,247E-10	8,3
hu7A4.v1	S	V	G	G	A	R		1,41E+06	3,94E-04	2,79E-10	9,15E+05	1,53E-03	1,67E-09	6,0
hu7A4.v2	S	V	G	G	G	R		1,60E+06	3,71E-04	2,32E-10	9,62E+05	1,17E-03	1,22E-09	5,3
hu7A4.v3	S	V	G	G	A	V		6,24E+05	3,39E-04	5,43E-10	3,22E+05	9,34E-04	2,90E-09	5,3
hu7A4.v4	S	V	G	G	G	V		4,82E+05	2,95E-04	6,12E-10	2,52E+05	9,66E-04	3,53E-09	6,3
hu7A4.v5	S	I	G	G	A	R		1,748E+06	6,363E-04	3,640E-10	1,461E+06	1,757E-03	1,203E-09	3,3
hu7A4.v6	S	I	G	G	G	R		2,845E+06	7,398E-04	2,600E-10	1,780E+06	1,863E-03	1,058E-09	4,1

hu7A4.v7	S	I	G	G	A	V	1,113E+06	5,735E-04	5,153E-10	2,428E+06	2,855E-03	1,176E-09	2,3
hu7A4.v8	S	I	G	G	G	V	8,326E+05	1,077E-03	1,294E-09	2,768E+05	3,411E-03	1,232E-08	9,5
hu7A4.v9	S	V	R	G	A	R	1,930E+06	2,304E-04	1,194E-10	1,280E+06	5,477E-04	4,279E-10	3,6
hu7A4.v10	S	V	R	G	G	R	1,684E+06	2,407E-04	1,429E-10	1,115E+06	5,632E-04	5,051E-10	3,5
hu7A4.v11	S	V	R	G	A	V	1,487E+06	2,323E-04	1,562E-10	8,049E+05	7,588E-04	9,427E-10	6,0
hu7A4.v12	S	V	R	G	G	V	9,159E+05	1,833E-04	2,001E-10	4,587E+05	9,580E-04	2,089E-09	10,4
hu7A4.v13	S	V	G	A	G	V	4,51E+05	6,14E-04	1,36E-09	2,13E+05	2,42E-03	1,14E-08	8,3
hu7A4.v14	S	I	G	A	G	V	6,14E+05	7,33E-04	1,19E-09	2,30E+05	3,61E-03	1,57E-08	13,2
hu7A4.v15	S	V	R	A	G	V	6,73E+05	3,77E-04	5,61E-10	2,90E+05	2,26E-03	7,80E-09	13,9

LC	HC		
	43	44	71 78
mu16F6	T	N	R L
hu16F6.v1	A	P	V F
hu16F6.v2	A	P	R L
hu16F6.v3	T	N	V F
hu16F6.v4	T	N	R L

HuTIR			TIR de mac, cangr.				Proporción mac, cangr/ha
Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD		
1,36 E+05	2,81E-04	2,07E-09	1,23E+05	9,13E-04	7,45E-09	3,6	
4,10E+04	7,67E-04	1,87E-08	4,64E+04	0,009242	1,99E-07	10,7	
4,62E+04	1,97E-04	4,25E-09	4,38E+04	0,002981	6,81E-08	16,0	
7,86E+04	3,23E-04	4,11E-09	7,26E+04	0,002503	3,45E-08	8,4	
8,99E+04	7,94E-05	8,84E-10	8,30E+04	9,13E-04	1,10E-08	12,5	

FIG. 4E-2



Unión de anticuerpos en presencia (línea discontinua abierta)
o ausencia (línea continua llena) de holo-Tf 6,3 μ M

hu7A4.v15 - Cuadrado

hu15G11.v5 - Rombo

hu7G7.v1 - Triángulo

Anticuerpo competitivo de Tf - Círculo

FIG. 5

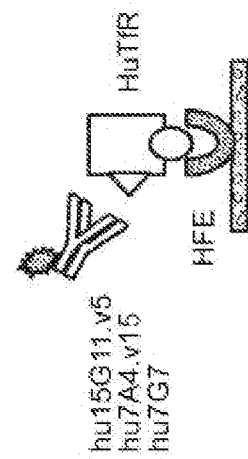
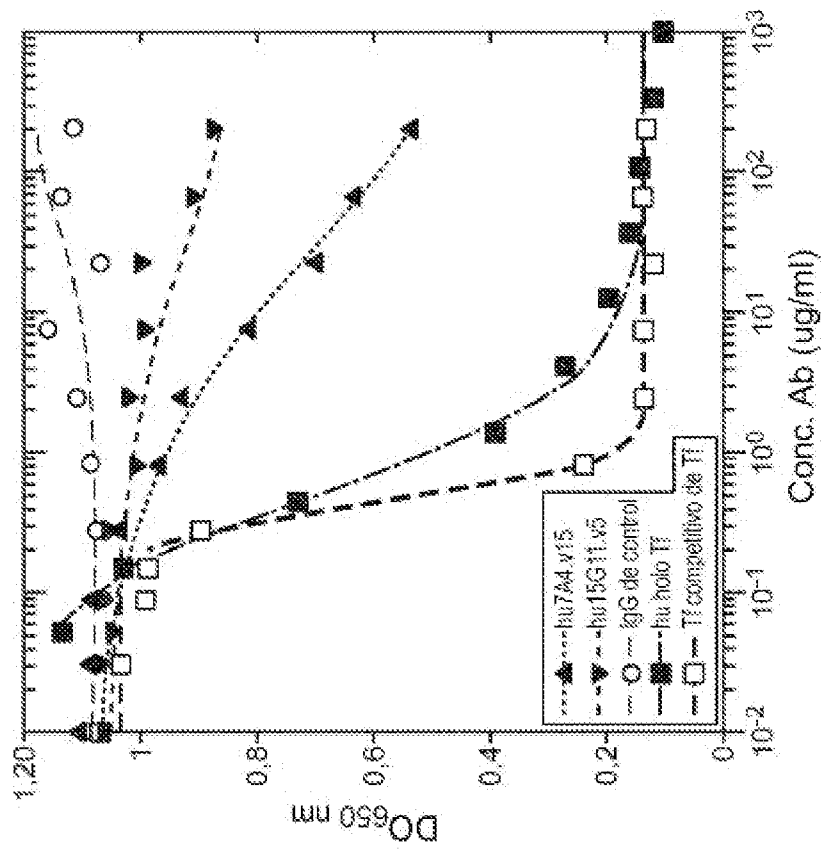


FIG. 6A

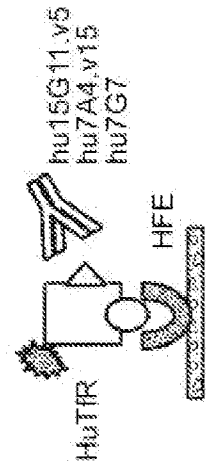
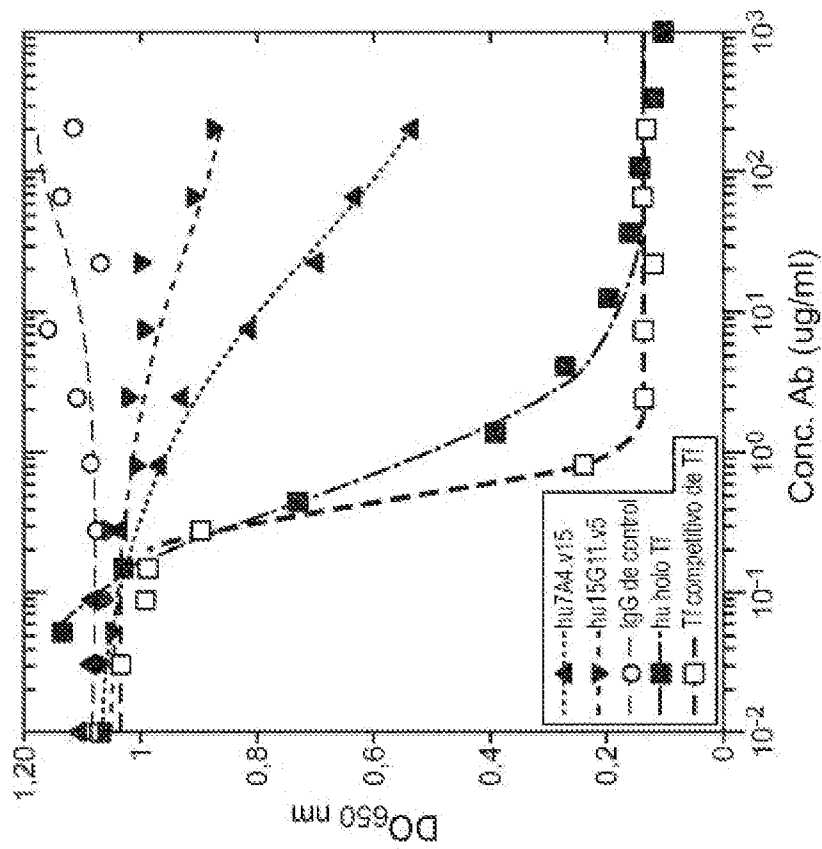


FIG. 6B

IgG frente a 7A4 Variant	ELISA (CE50) usando IgG		Biacore (SCK) ajuste 1:1 (IgG)		Biacore en estado de equilibrio (IgG)		Biacore (Fab)	
	huTfR (ng/ml)	TfR de mac. cangr. (ng/ml)	huTfR (nM)	TfR de mac. cangr. (nM)	huTfR (nM)	TfR de mac. cangr. (nM)	huTfR (nM)	TfR de mac. cangr. (nM)
7A4.v15	14,8	14,2	0,58	7,8			0,4	4,3
CDR-H3	G95A	13,5	41,8					
	L96A	15,5	28,7					
	S97A							
	G98A	19,4	24,7					
	N99A	17	82,2	11	22	19	77	
	Y100A	15,9	24					
	V100aA							
	M100bA	16,1	16,9					
CDR-L3	D101A	17,3	18,5					
	Y102A	12,6	17,8					
	Q89A	10,9	13,8	18	570	41	329	130
	Q90A	9,3	181					760
	S91A	11,3	16,3					
	N32A	8,7	13,7					
	E93A	12,2	17,6					
	P95A	9,7	15,9					
	P96A	10	16,2					
	T97A	12	22,6					

CDR L3										CDR H3										SEQ ID NO:	
89	90	91	92	93	94	95	96	97		95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	102	131
Q	Q	S	N	E	A	P	P	T		G	L	S	G	N	Y	V	M	D	Y		

FIG. 7B

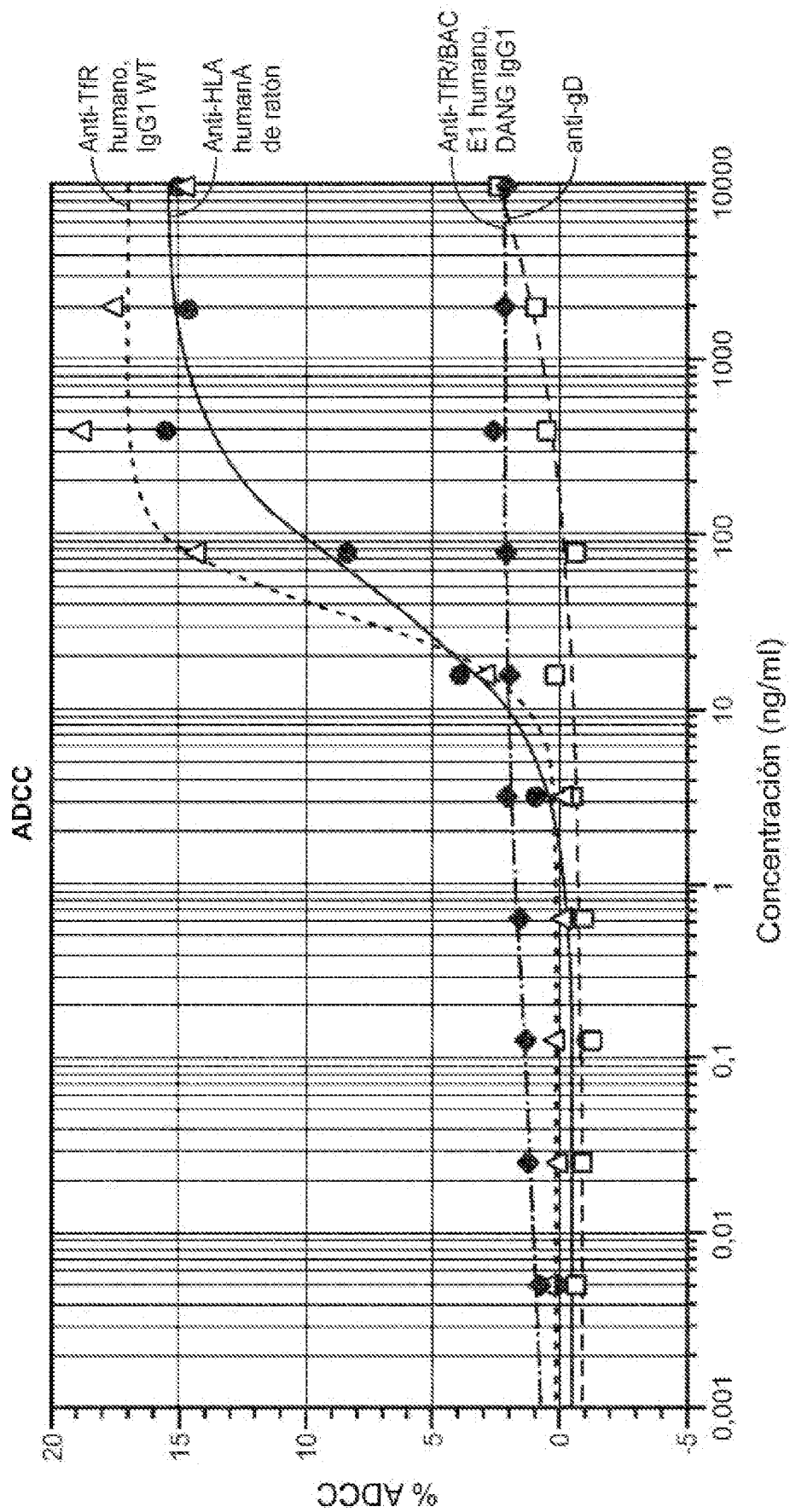


FIG. 8A

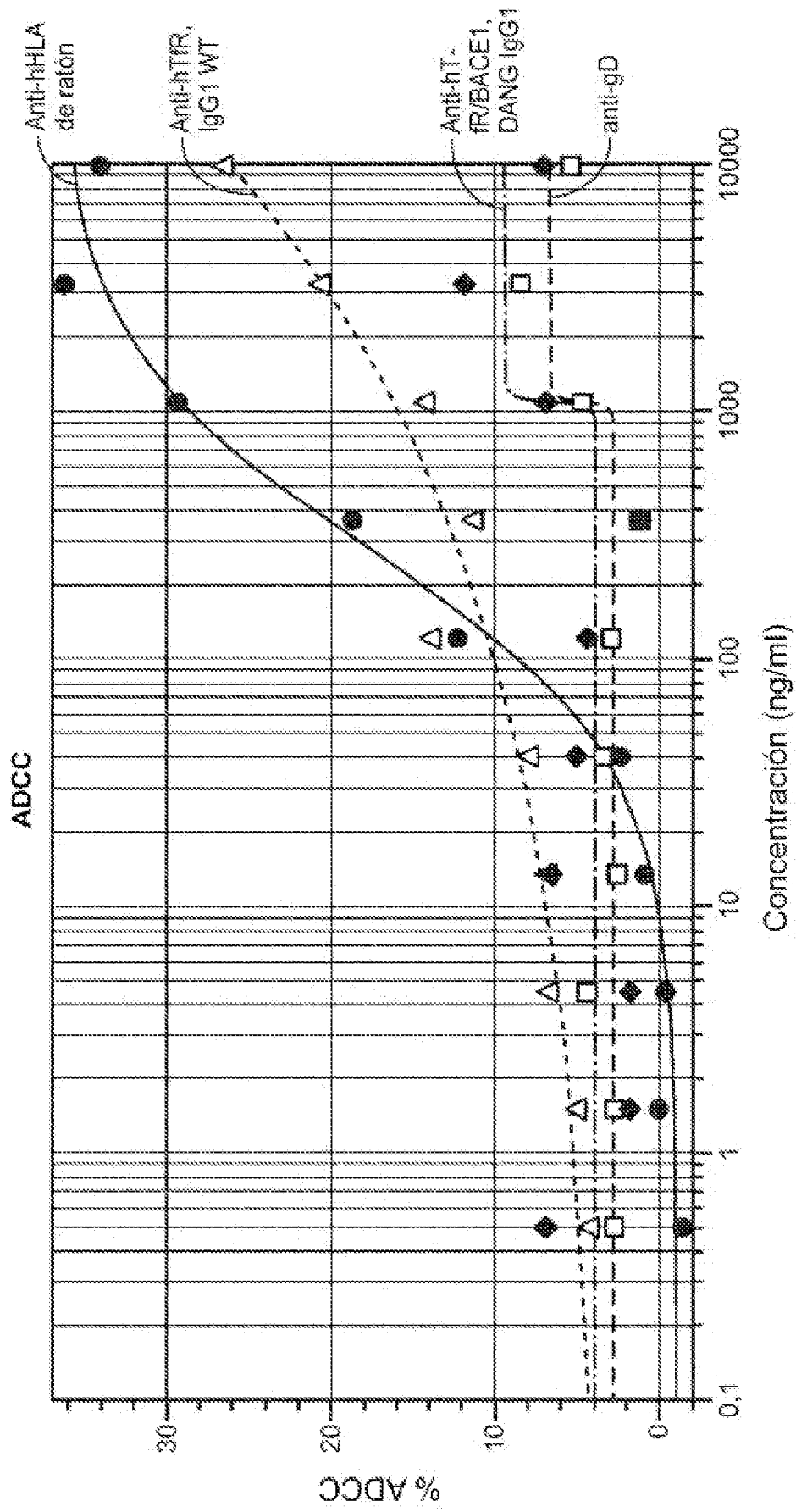


FIG. 8B

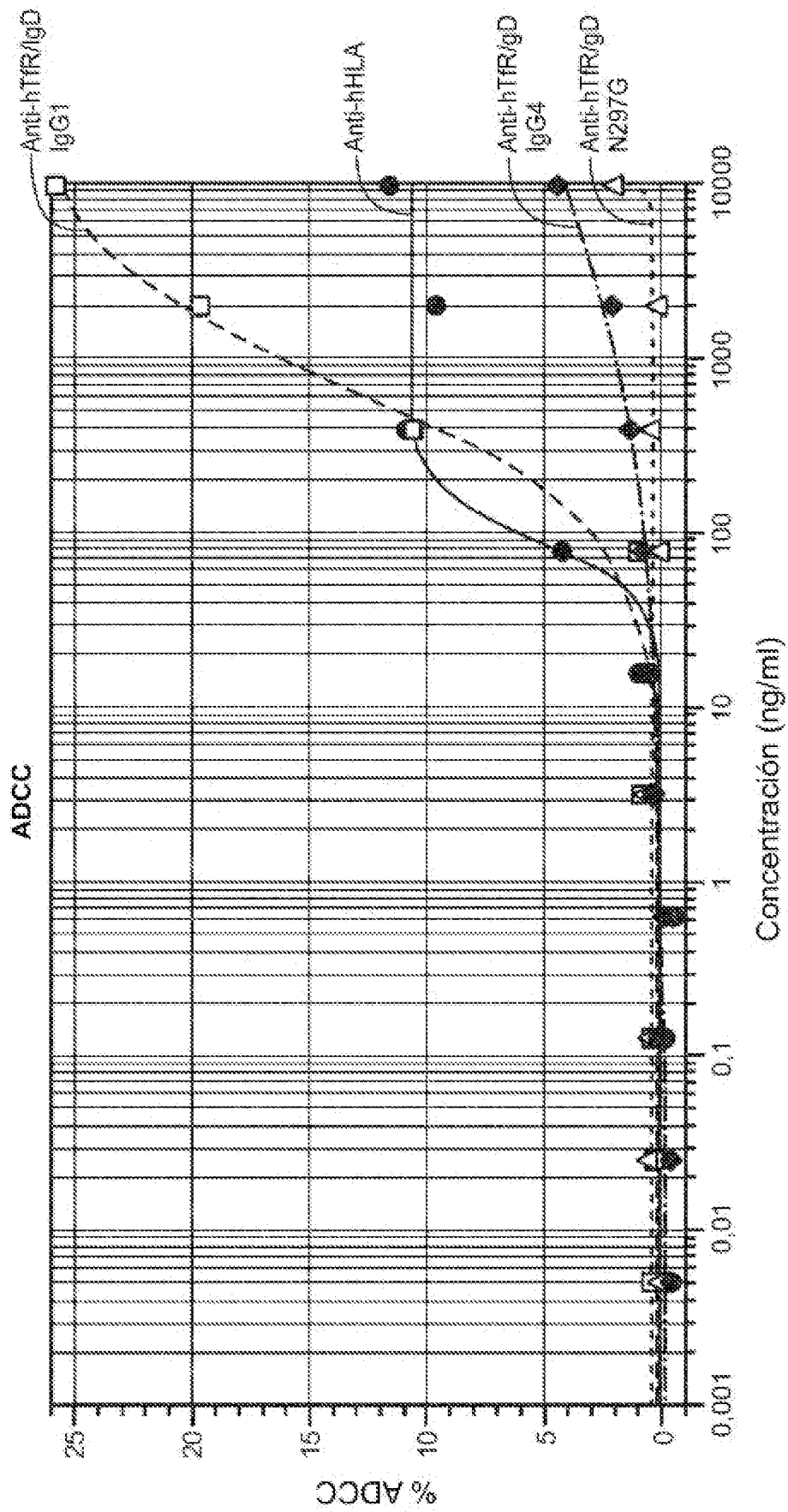


FIG. 9A

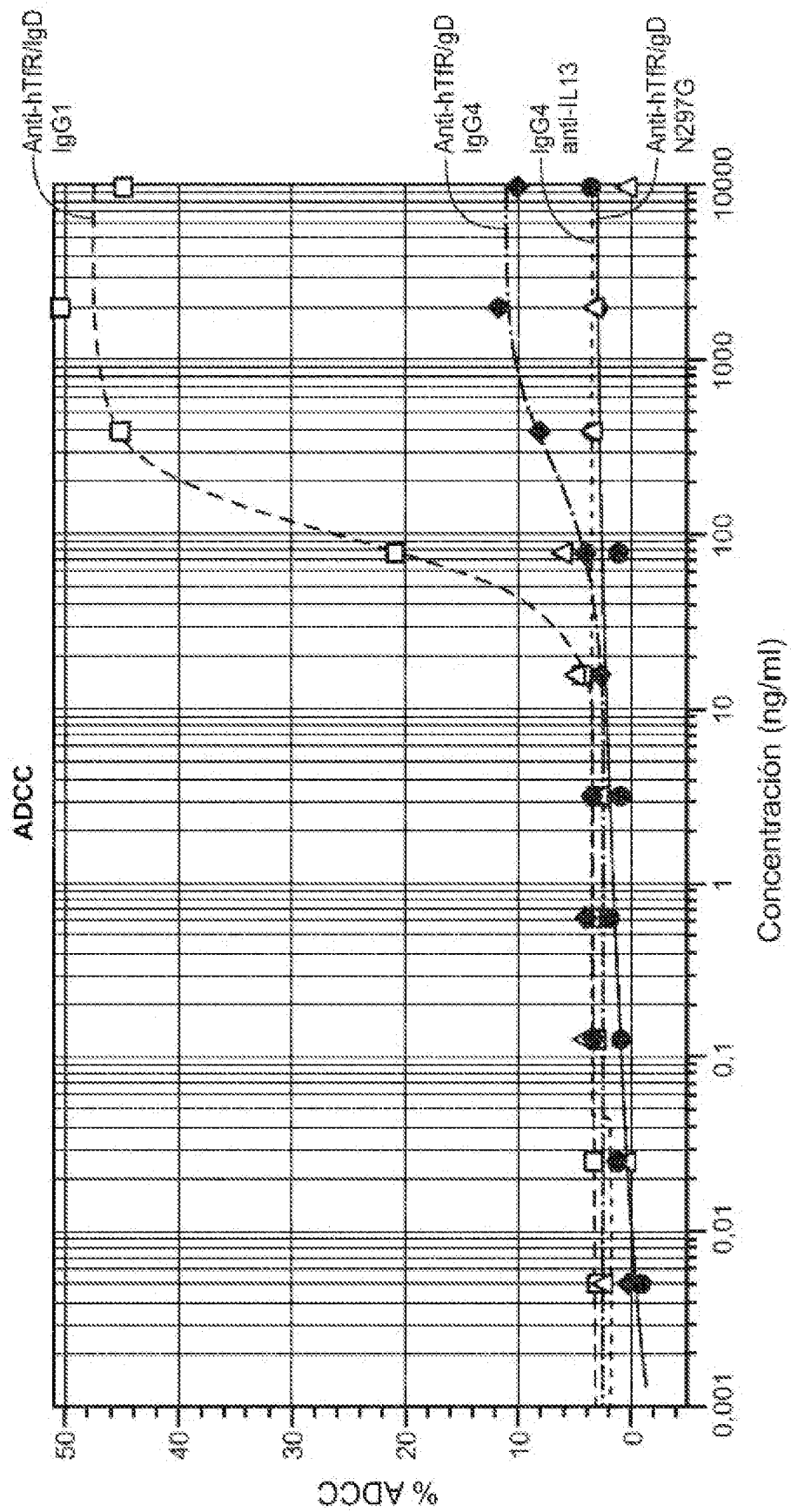


FIG. 9B

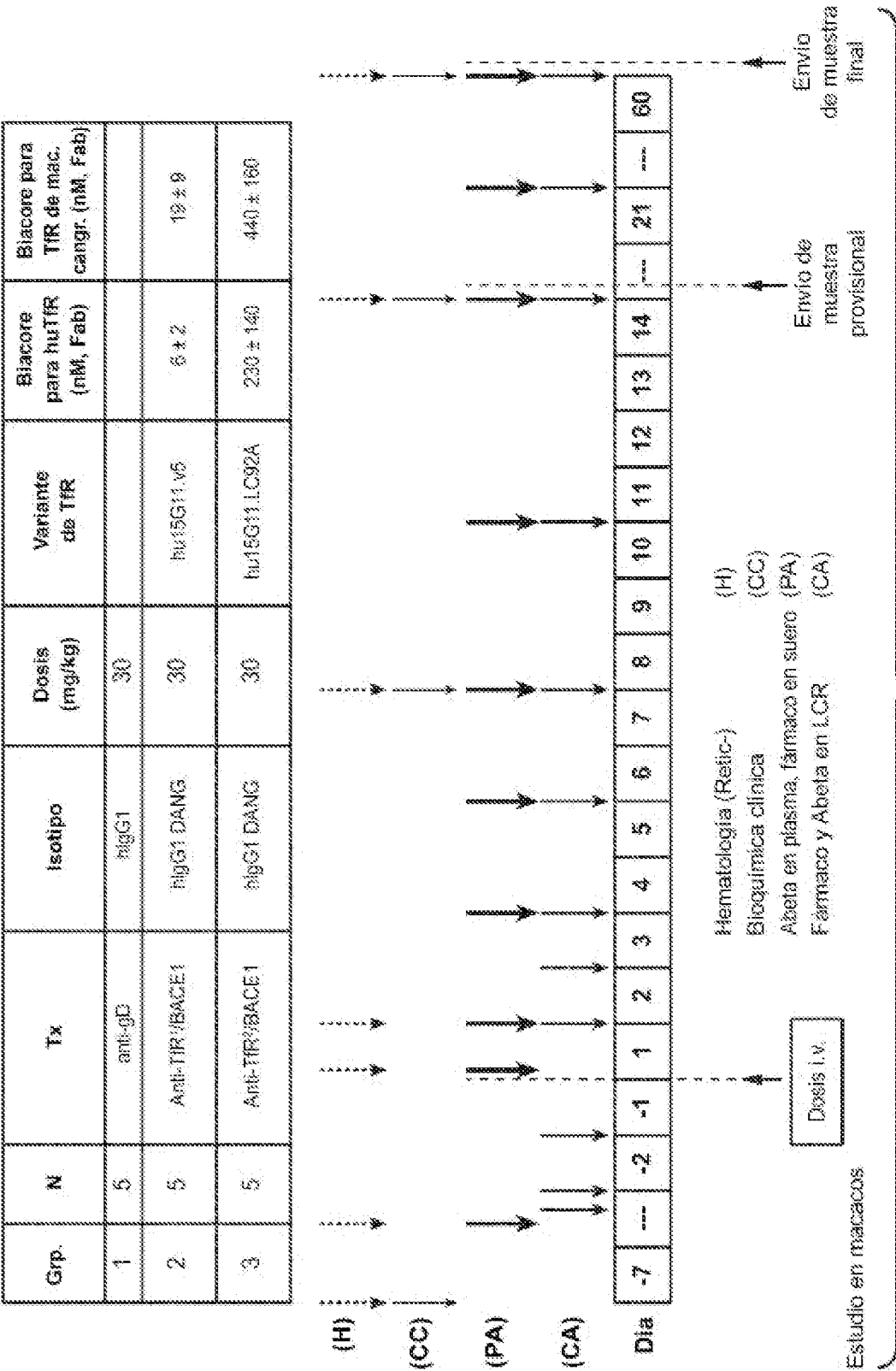


FIG. 10

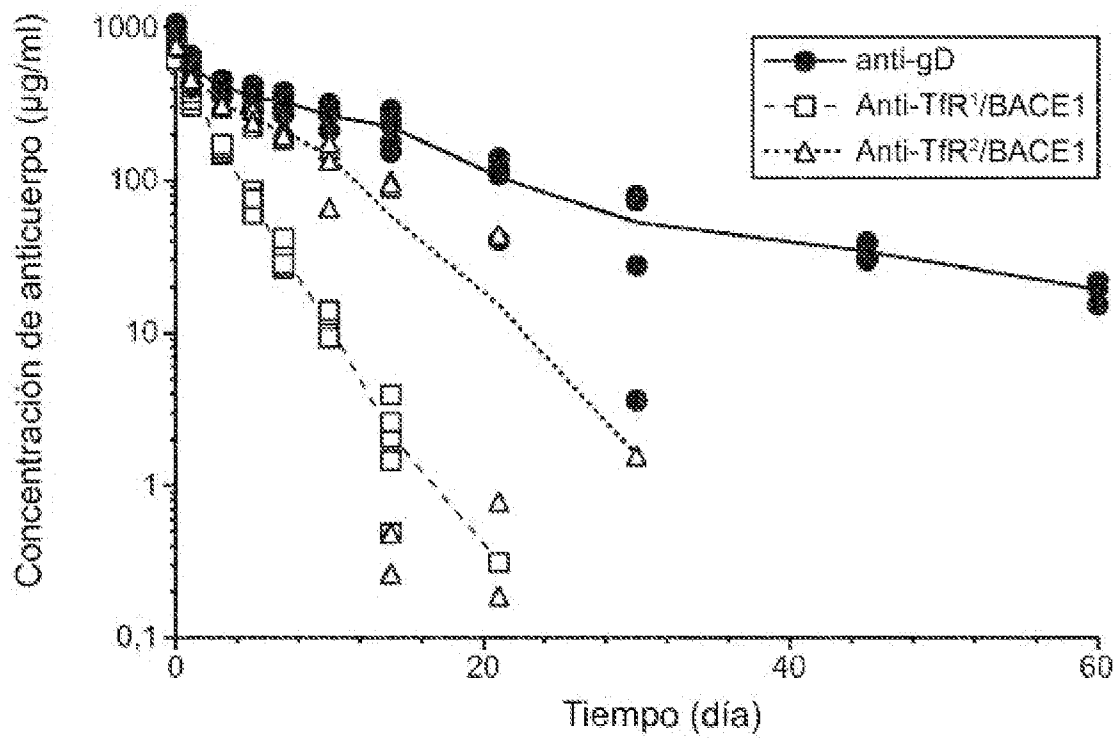


FIG. 11A

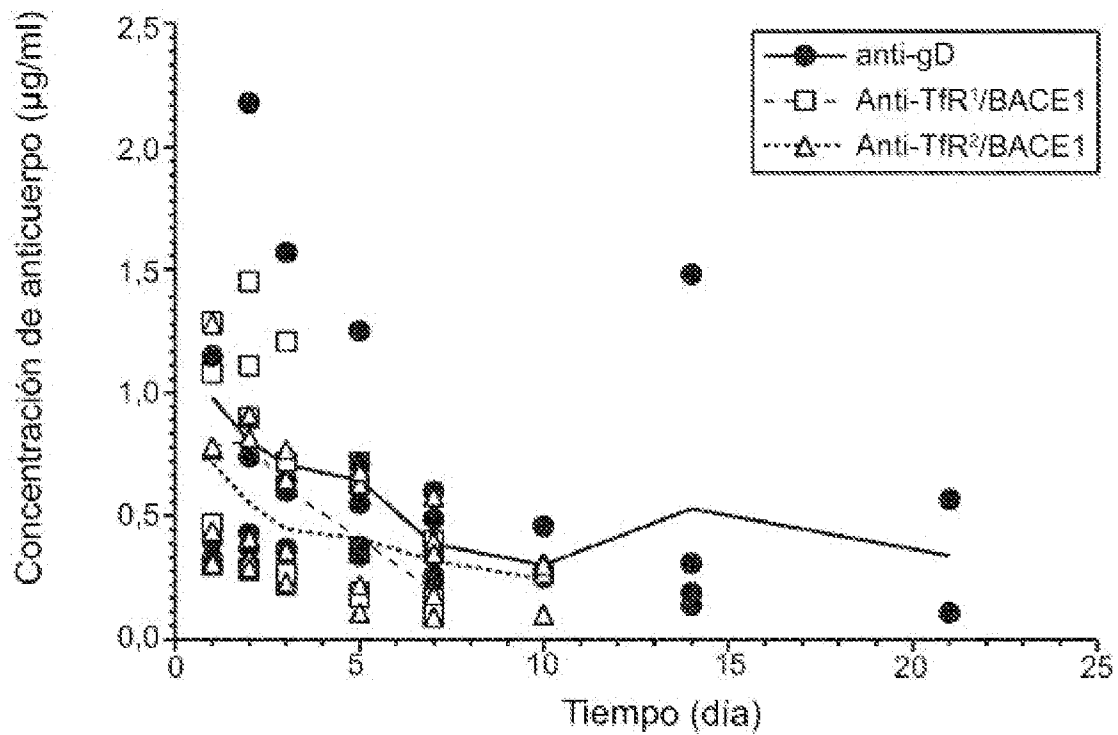
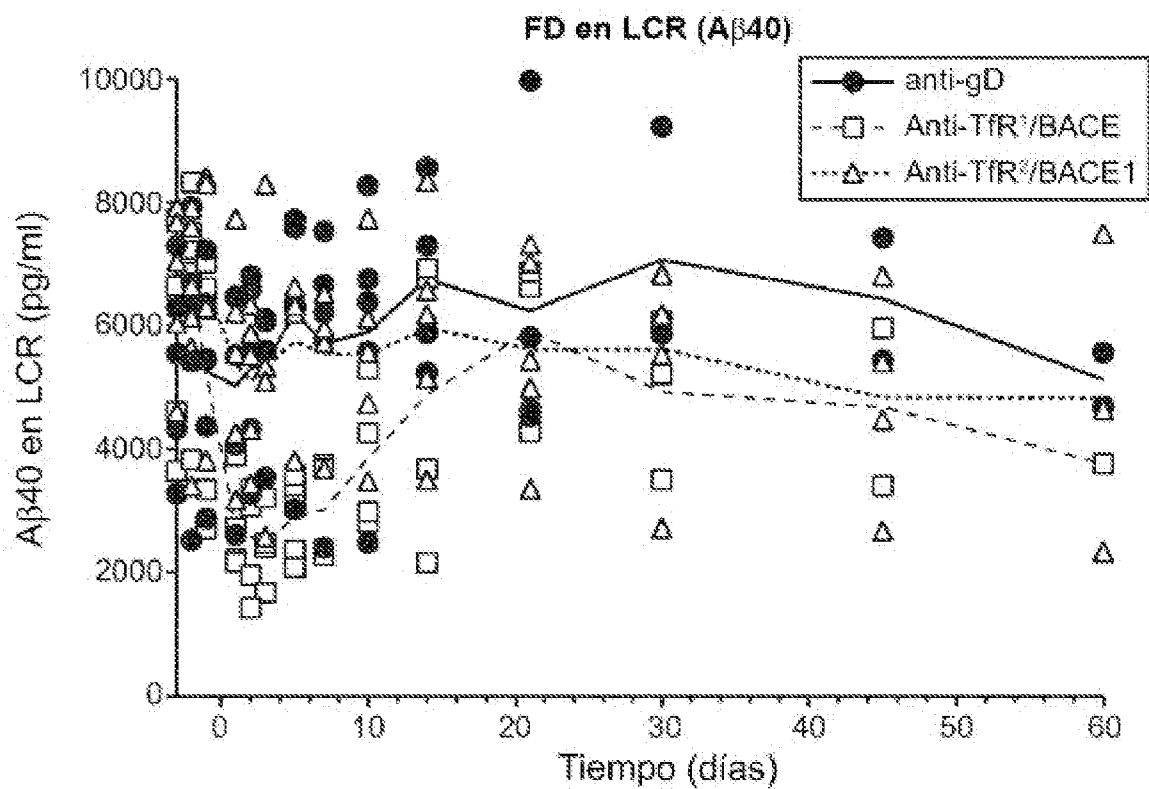
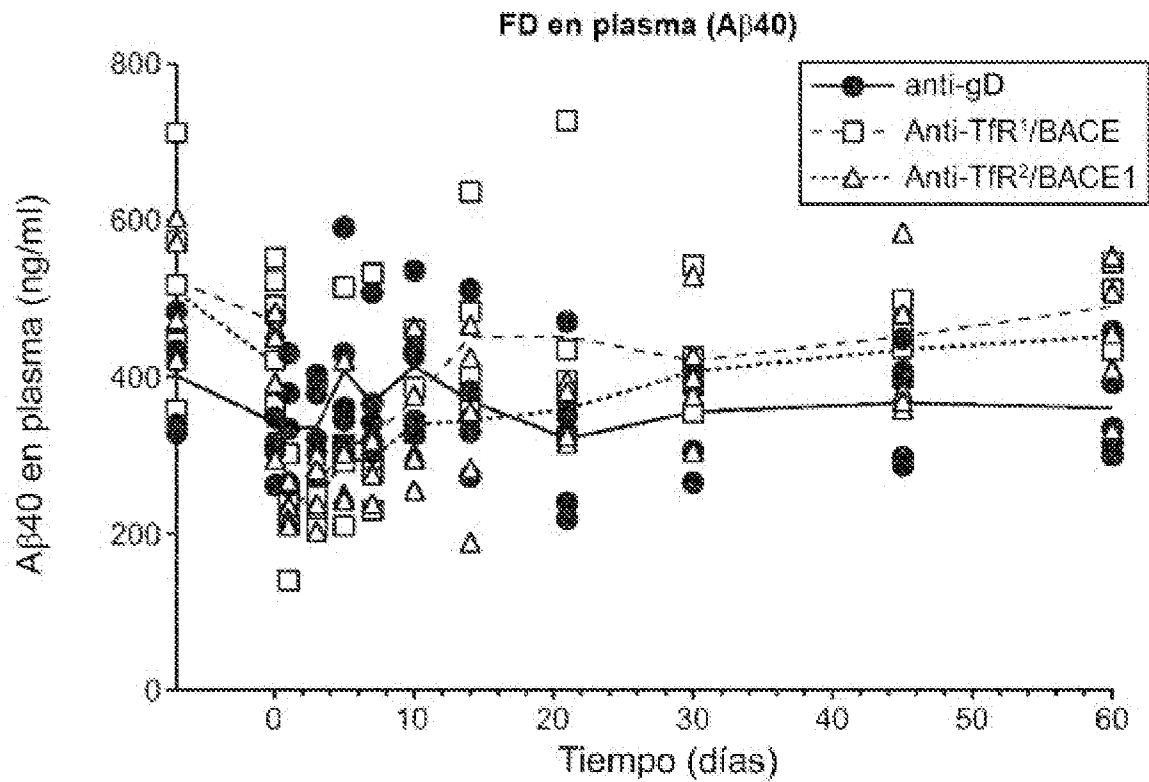


FIG. 11B



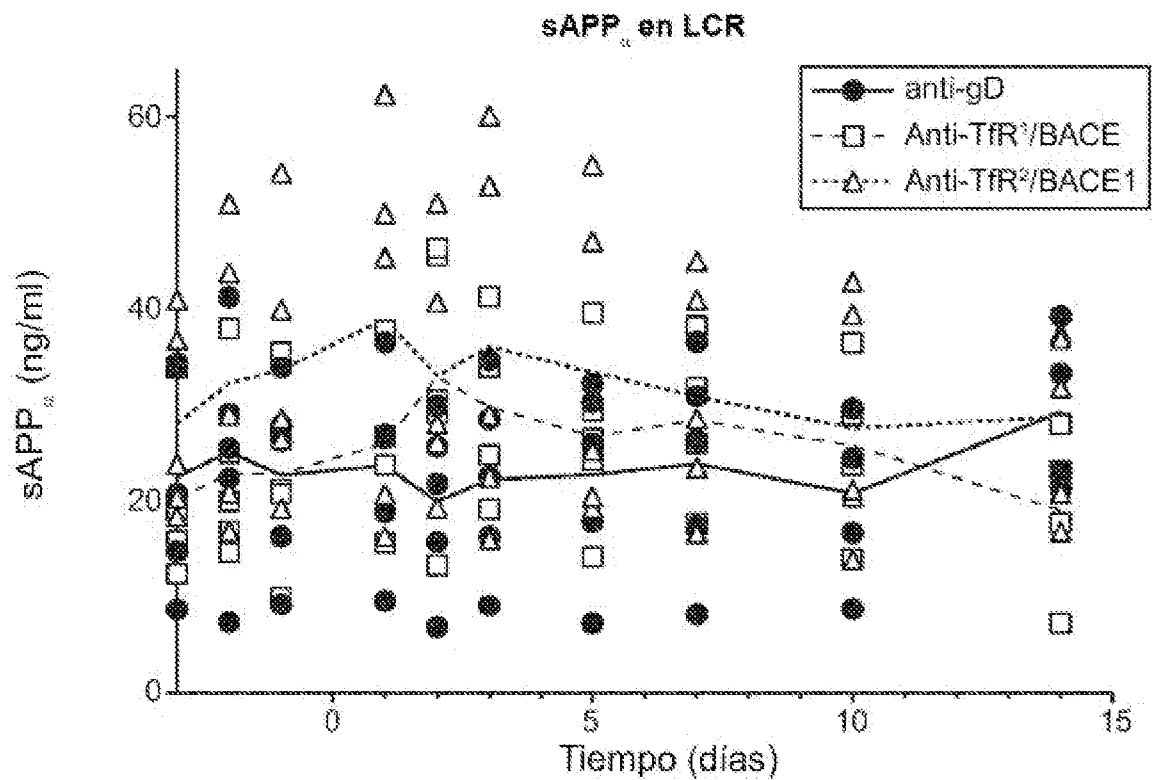


FIG. 12C

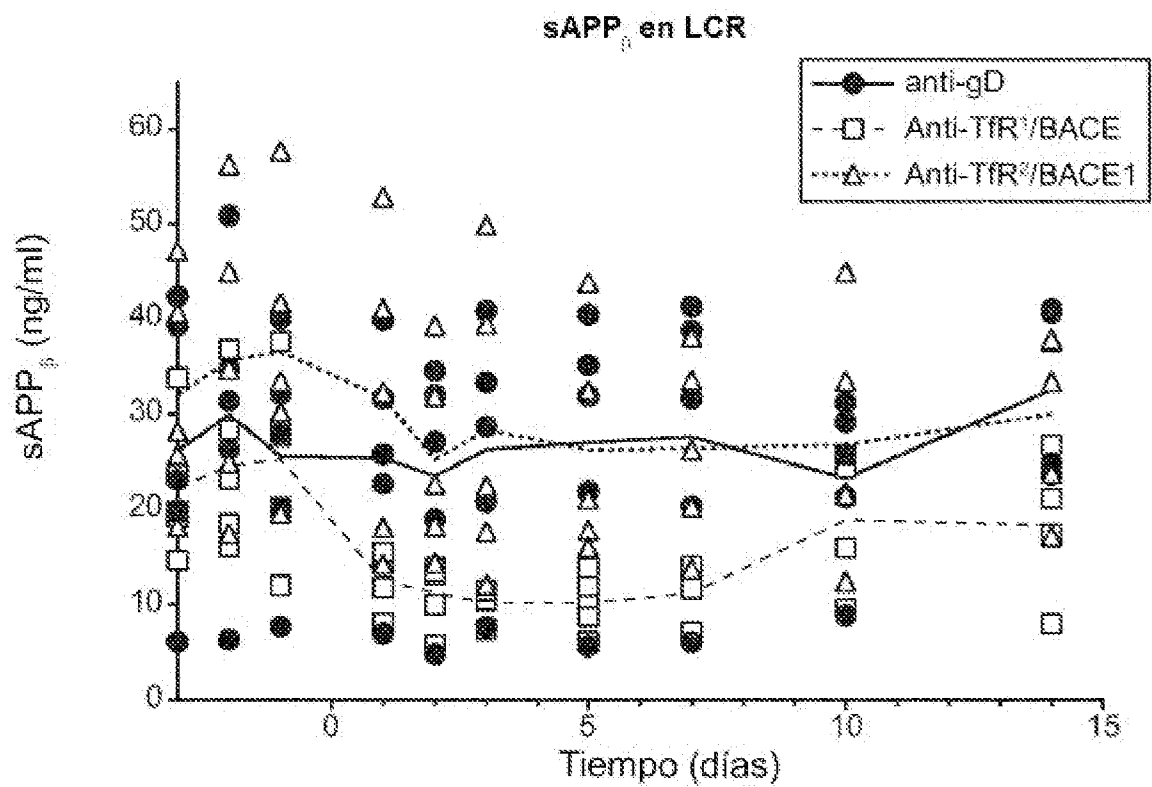
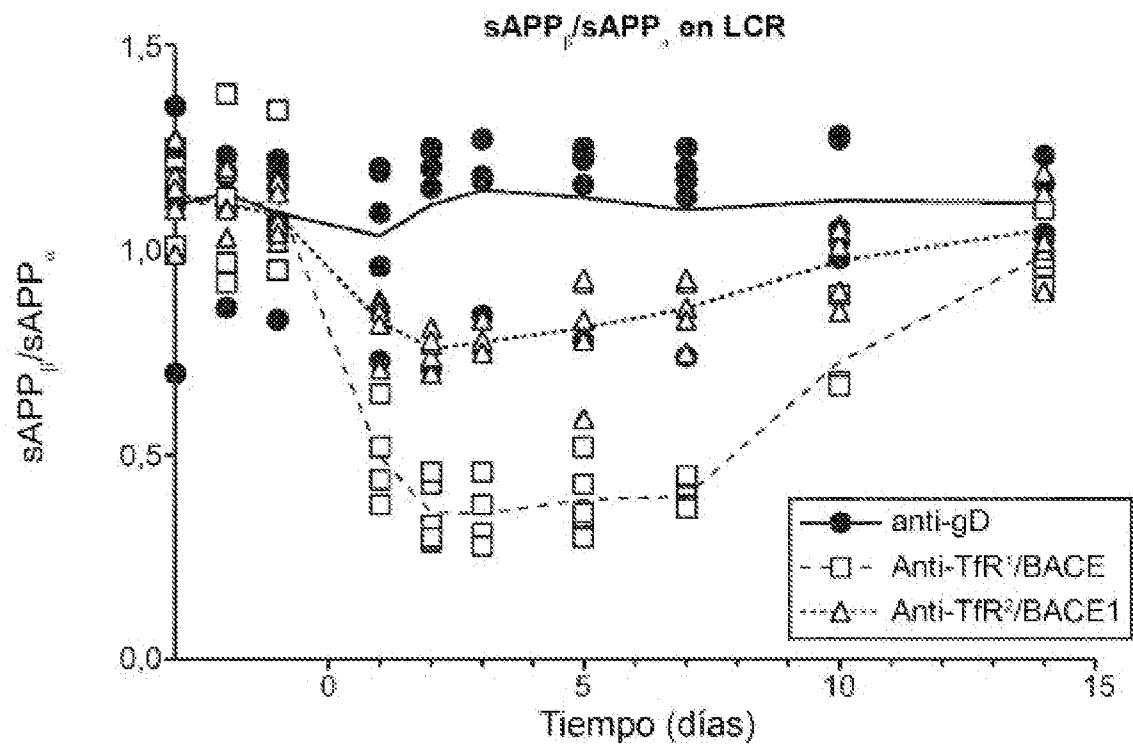
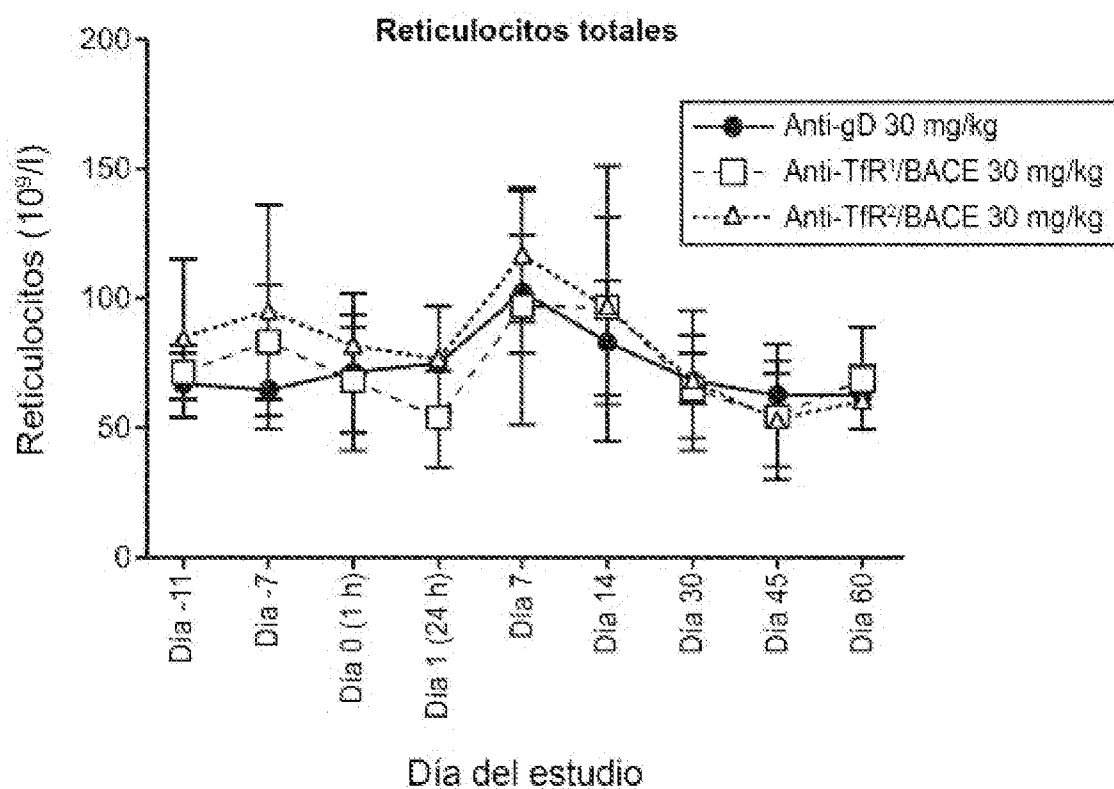
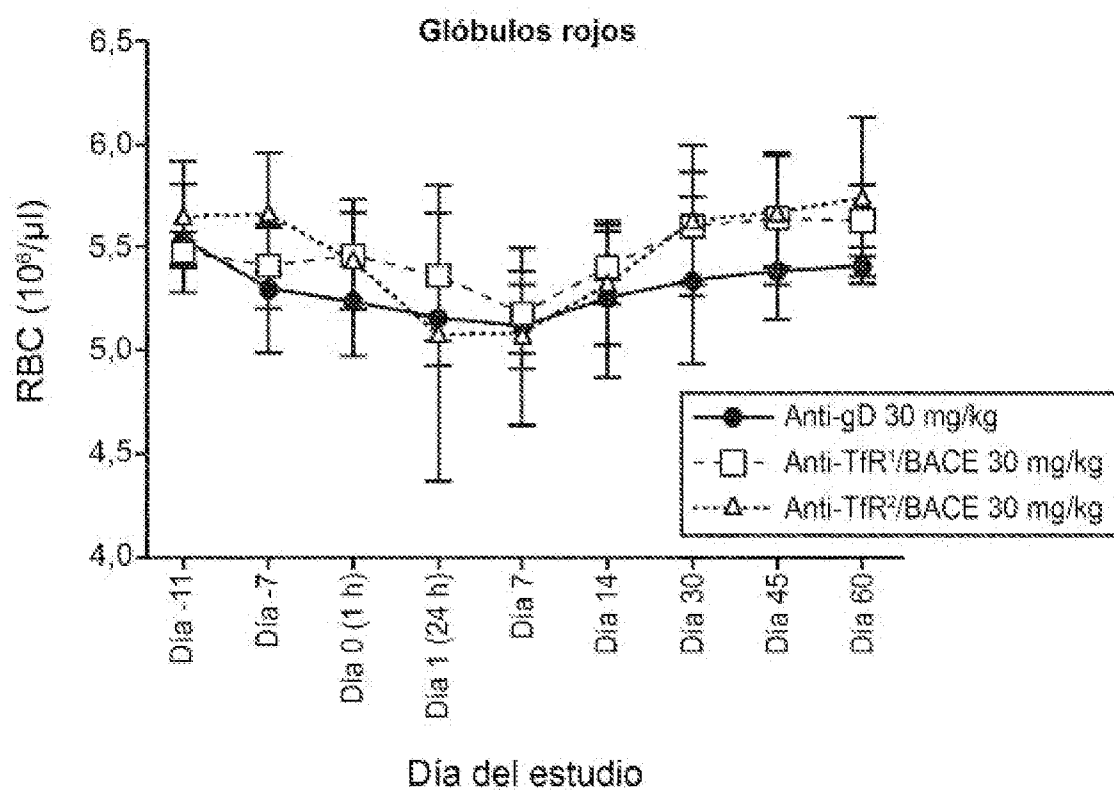
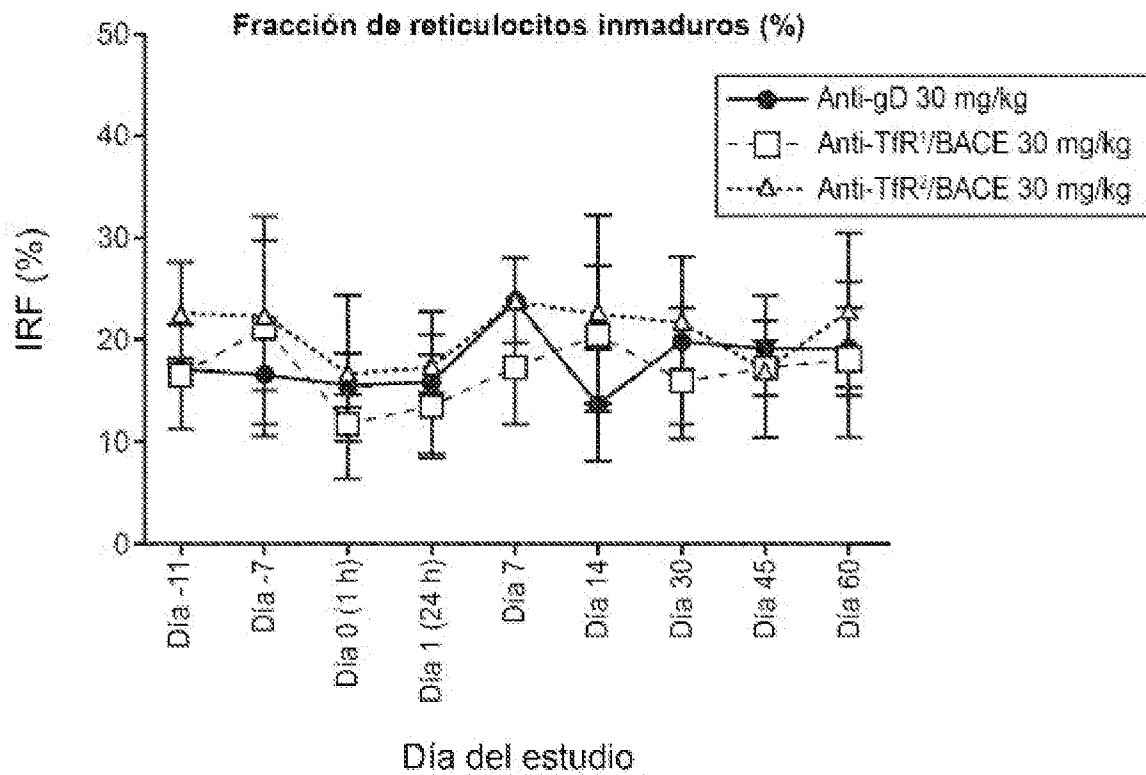
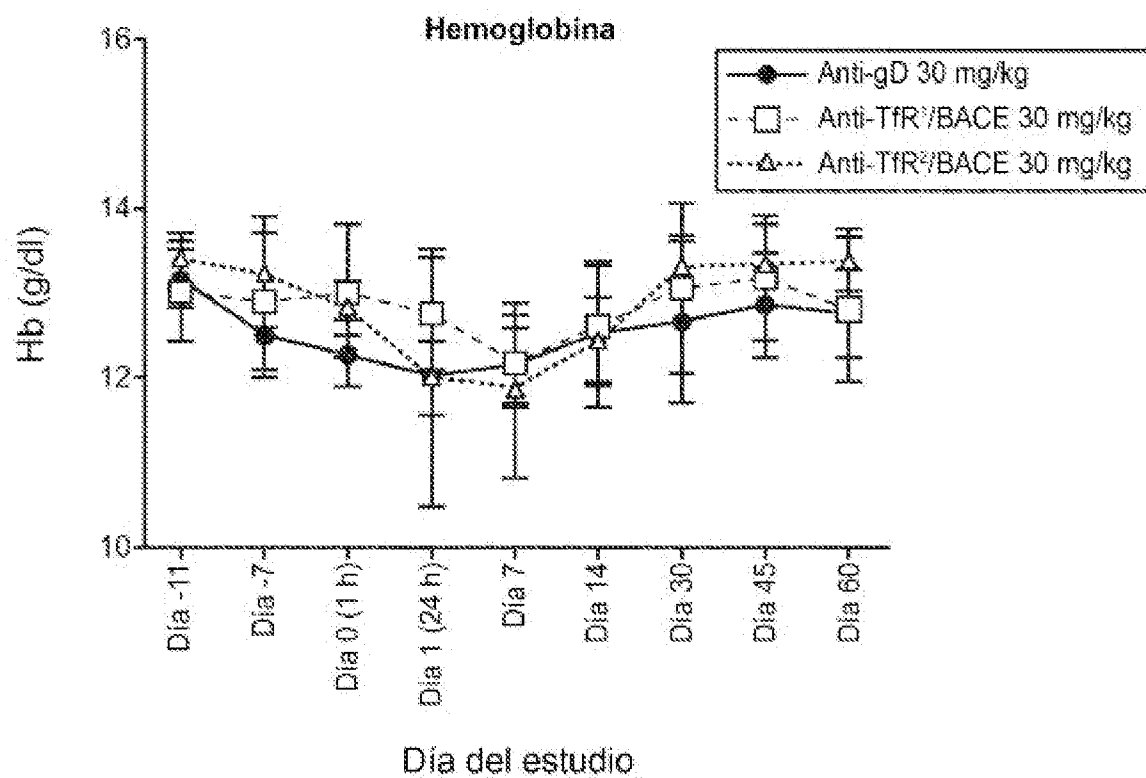


FIG. 12D



**FIG. 13A****FIG. 13B**

**FIG. 13C****FIG. 13D**

Grp.	N	Tx	Isotipo	Dosis (mg/kg)	Variante de Tfr	Biocore para huTfr (nM, Fab)	Biocore para Tfr de mac. cangr. (nM, Fab)
1	5	anti-gD	hlgG1	30			
2	5	Anti-TFR2/BACE1	hlgG1 DANG	30	hu15G11.v5	6 ± 2	19 ± 9
3	5	Anti-TFR2/BACE1	hlgG1 DANG	30	hu15G11.LC92A	230 ± 140	440 ± 160
4	5	Anti-BACE1	hlgG1	30	N/A	-	-

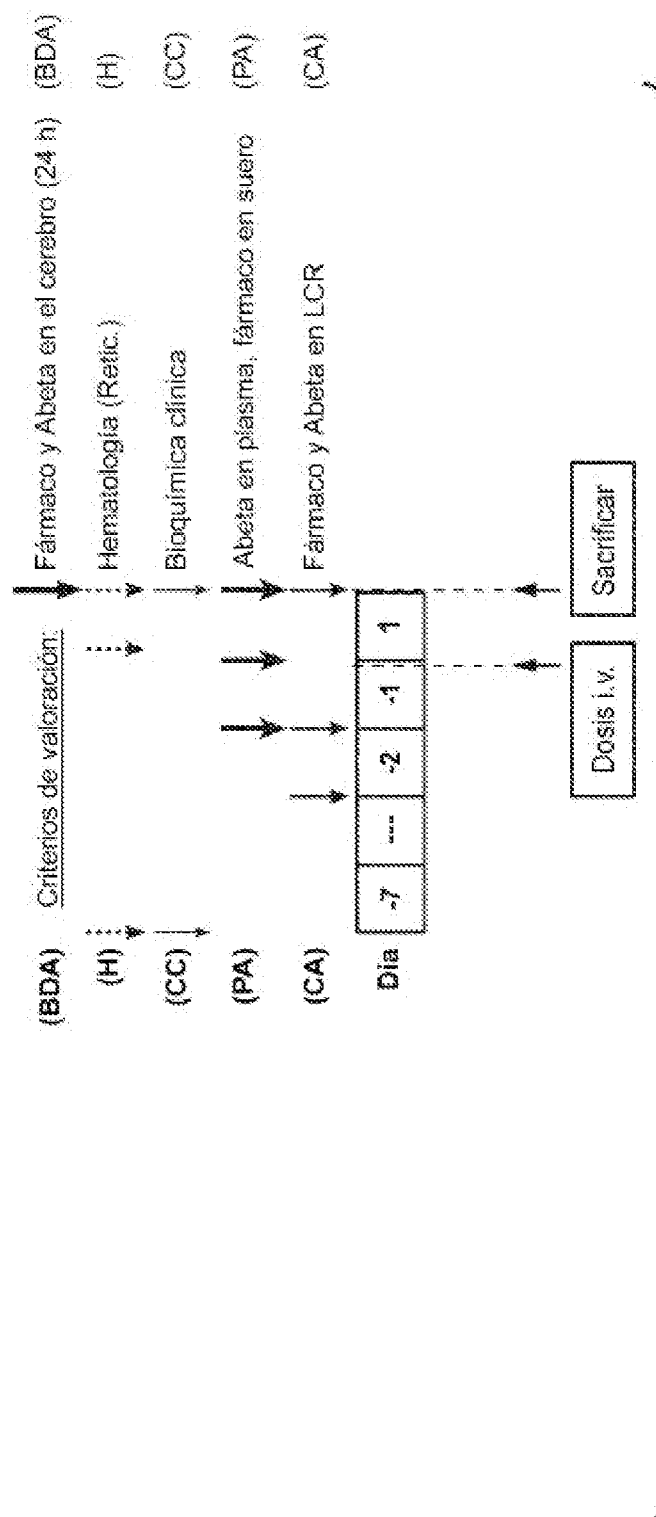


FIG. 14

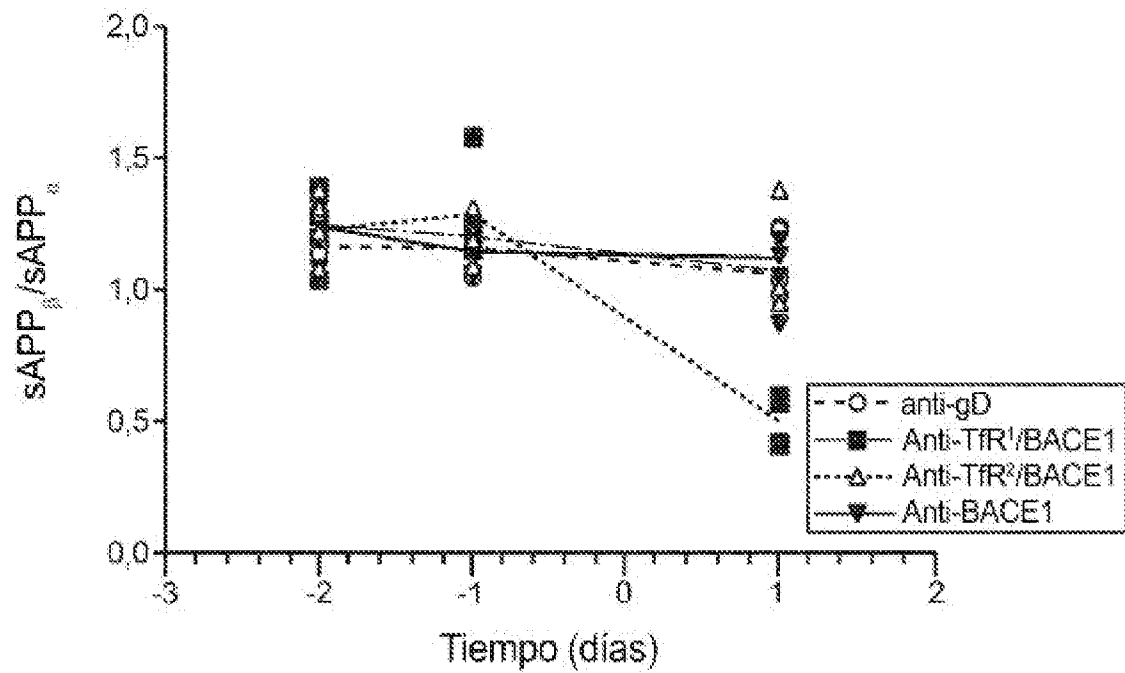


FIG. 15A

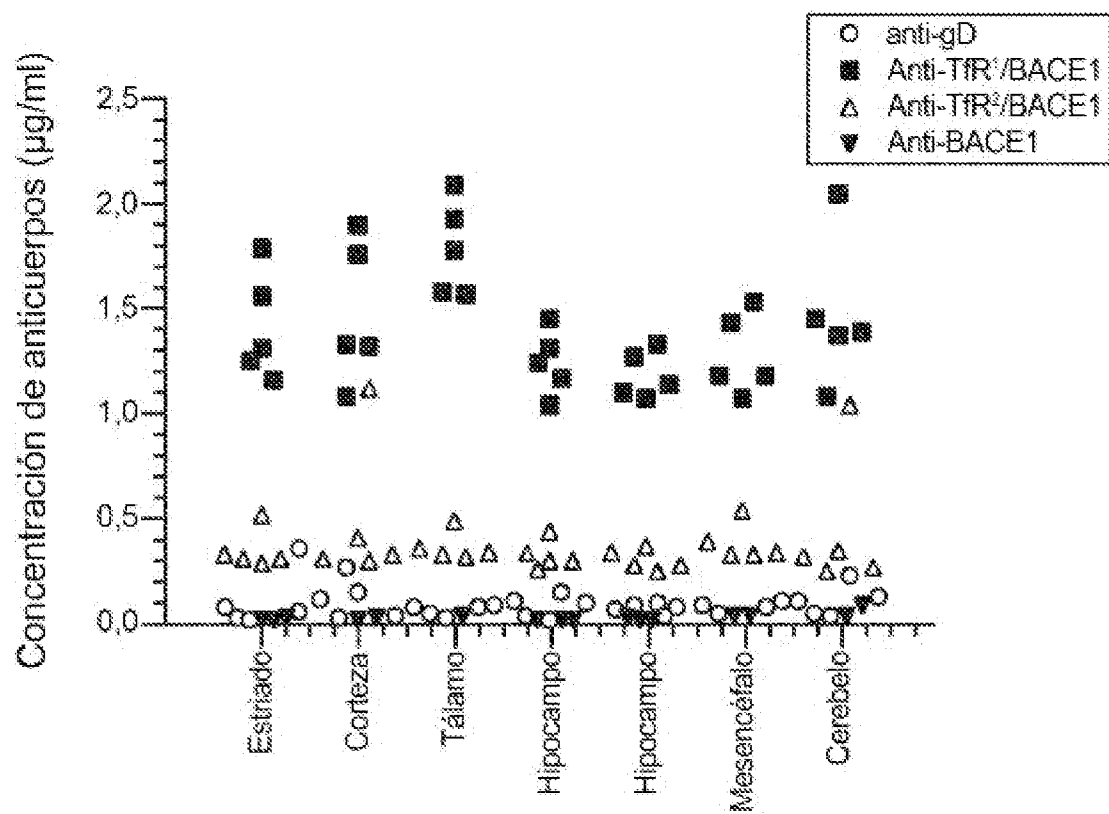


FIG. 15B

Kabat n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37								
	Kabat - CDR L1																																												
	Choithia - CDR L1																																												
	Contacto - CDR L1																																												
YW412.8	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	E	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q								
YW412.8.31	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	E	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q								
YW412.8.30	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	E	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q								
YW412.8.2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	E	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q								
YW412.8.29	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	E	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q								
YW412.8.51	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	E	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q								
Kabat n.º	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80		
	Kabat - CDR L2																																												
	Choithia - CDR L2																																												
	Contacto - CDR L2																																												
YW412.8	Q	R	P	G	K	A	P	K	L	L	I	V	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S		
YW412.8.31	Q	R	P	G	K	A	P	K	L	L	I	V	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S		
YW412.8.30	Q	R	P	G	K	A	P	K	L	L	I	V	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S		
YW412.8.2	Q	R	P	G	K	A	P	K	L	L	I	V	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S		
YW412.8.29	Q	R	P	G	K	A	P	K	L	L	I	V	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S		
YW412.8.51	Q	R	P	G	K	A	P	K	L	L	I	V	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S		
Kabat n.º	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108																	
	Kabat - CDR L3																	Seq ID NO: 132																											
	Choithia - CDR L3																	Seq ID NO: 133																											
	Contacto - CDR L3																	Seq ID NO: 134																											
YW412.8	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	T	T	E	G	Q	G	T	K	Y	S	I	K	R	Seq ID NO: 132																	
YW412.8.31	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	T	T	E	G	Q	G	T	K	Y	S	I	K	R	Seq ID NO: 133																	
YW412.8.30	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	T	T	E	G	Q	G	T	K	Y	S	I	K	R	Seq ID NO: 134																	
YW412.8.2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	T	T	E	G	Q	G	T	K	Y	S	I	K	R	Seq ID NO: 135																	
YW412.8.29	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	T	T	E	G	Q	G	T	K	Y	S	I	K	R	Seq ID NO: 136																	
YW412.8.51	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	T	T	E	G	Q	G	T	K	Y	S	I	K	R	Seq ID NO: 137																	

FIG. 16A

Kabat n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
YW4128	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	E	T	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW4128.31	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	E	T	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A						
YW4128.30	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	E	T	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW4128.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	E	T	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW4128.29	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	E	T	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW4128.51	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	E	T	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
Kabat n.º	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78						
YW4128	P	G	K	G	L	E	R	K	V	G	K	I	S	P	A	C	C	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	X	N	T	A							
YW4128.31	P	G	K	G	L	E	R	K	V	G	K	I	S	P	A	C	C	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	X	N	T	A							
YW4128.30	P	G	K	G	L	E	R	K	V	G	K	I	S	P	A	C	C	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	X	N	T	A							
YW4128.2	P	G	K	G	L	E	R	K	V	G	K	I	S	P	A	C	C	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	X	N	T	A							
YW4128.29	P	G	K	G	L	E	R	K	V	G	K	I	S	P	A	C	C	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	X	N	T	A							
YW4128.51	P	G	K	G	L	E	R	K	V	G	K	I	S	P	A	C	C	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	X	N	T	A							
Kabat n.º	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	I	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
YW4128	Y	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	T	S	P	W	Y	K	D	Y	W	G	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	138						
YW4128.31	Y	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	T	S	P	W	Y	K	D	Y	W	G	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	139						
YW4128.30	Y	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	T	S	P	W	Y	K	D	Y	W	G	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	138						
YW4128.2	Y	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	T	S	P	W	Y	K	D	Y	W	G	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	138						
YW4128.29	Y	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	T	S	P	W	Y	K	D	Y	W	G	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	138						
YW4128.51	Y	L	Q	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	T	S	P	W	Y	K	D	Y	W	G	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	138						

FIG. 16B

Kabat n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37												
	<div>Kabat - CDR L1</div> <div>Chothia - CDR L1</div> <div>Contacto - CDR L1</div>																																																
Fab12	D	I	D	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	N	Y	Q												
LC6 IgG	D	I	D	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	N	Y	Q												
LC9 IgG	D	I	D	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	N	Y	Q												
LC10 IgG	D	I	D	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	N	Y	Q												
Kabat n.º	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80						
	<div>Kabat - CDR L2</div> <div>Chothia - CDR L2</div> <div>Contacto - CDR L2</div>																																																
Fab12	Q	K	P	G	X	A	P	X	L	L	I	Y	S	A	S	S	L	V	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
LC6 IgG	Q	K	P	G	X	A	P	X	L	L	I	S	K	A	S	S	L	V	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
LC9 IgG	Q	K	P	G	X	A	P	X	L	L	I	N	Y	A	S	S	L	V	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
LC10 IgG	Q	K	P	G	X	A	P	X	L	L	I	N	K	A	S	S	L	V	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
Kabat n.º	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108																					
	<div>Kabat - CDR L3</div> <div>Chothia - CDR L3</div> <div>Contacto - CDR L3</div>																																																
Fab12	E	D	F	A	T	T	Y	C	Q	Q	Y	S	Z	S	P	T	T	G	Q	G	T	X	V	R	I	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
LC6 IgG	E	D	F	A	T	T	Y	C	Q	Q	Y	S	Z	S	P	T	T	G	Q	G	T	X	V	R	I	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
LC9 IgG	E	D	F	A	T	T	Y	C	Q	Q	Y	S	Z	S	P	T	T	G	Q	G	T	X	V	R	I	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
LC10 IgG	E	D	F	A	T	T	Y	C	Q	Q	Y	S	Z	S	P	T	T	G	Q	G	T	X	V	R	I	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		

FIG. 17A

FIG. 17B

```

1  EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAS
51  INSNGGSTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCASGD
101 YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT
151 VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT KTYTCNVDHK
201 PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
251 VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV
301 LHQDNLNGKE YKCKVSNKGL FSSIIEKTISK AKGQPREPQV YTLFPSQEEM
351 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTFPVL DSDGSFFLYS
401 RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG (SEQ ID NO:145)

```

FIG. 18A

```

1  DIVMTQSPLS LEVTPGEPAS ISCRSSQSLV YSNGDTYLHW YLQKPGQSPQ
51  LLIYKVSNRK SGVPDRFSGS GSQTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP
101 WTFQGQTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDESTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID NO:146)

```

FIG. 18B

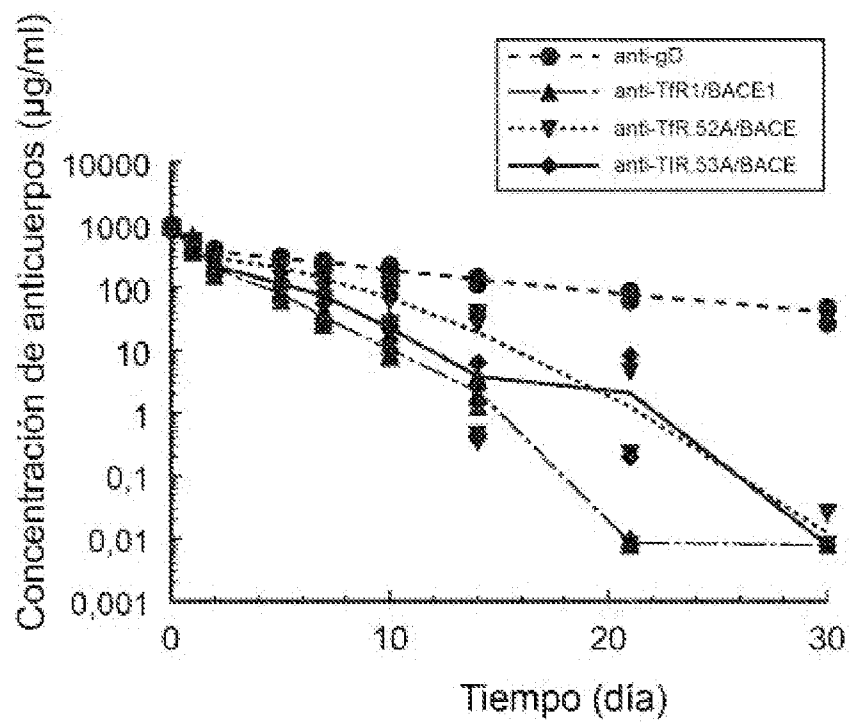


FIG. 19

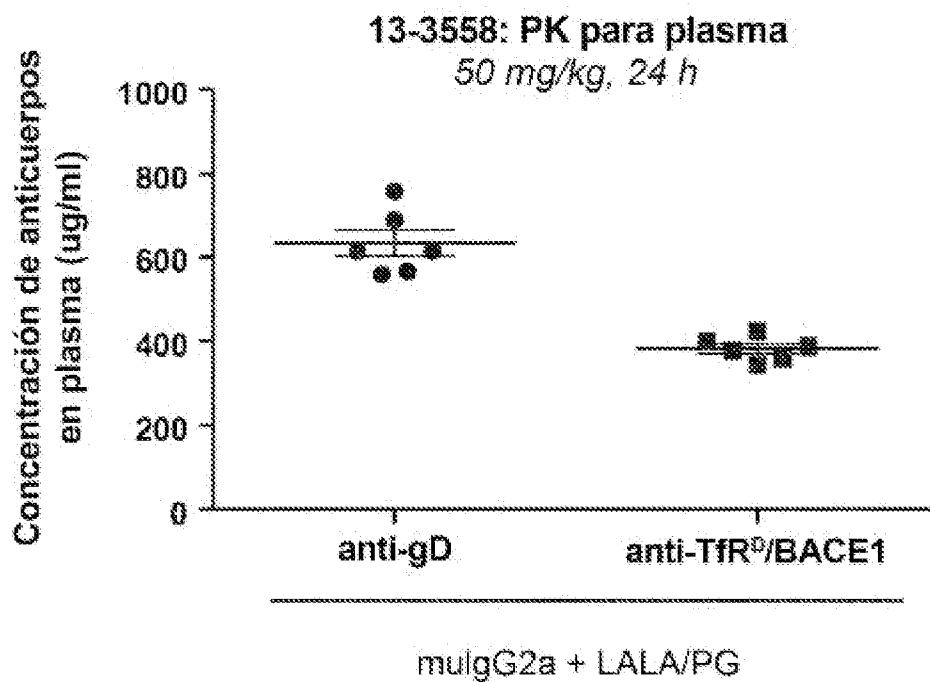


FIG. 20

13-3558: Fracción de reticulocitos inmaduros

50 mg/kg, 24 h

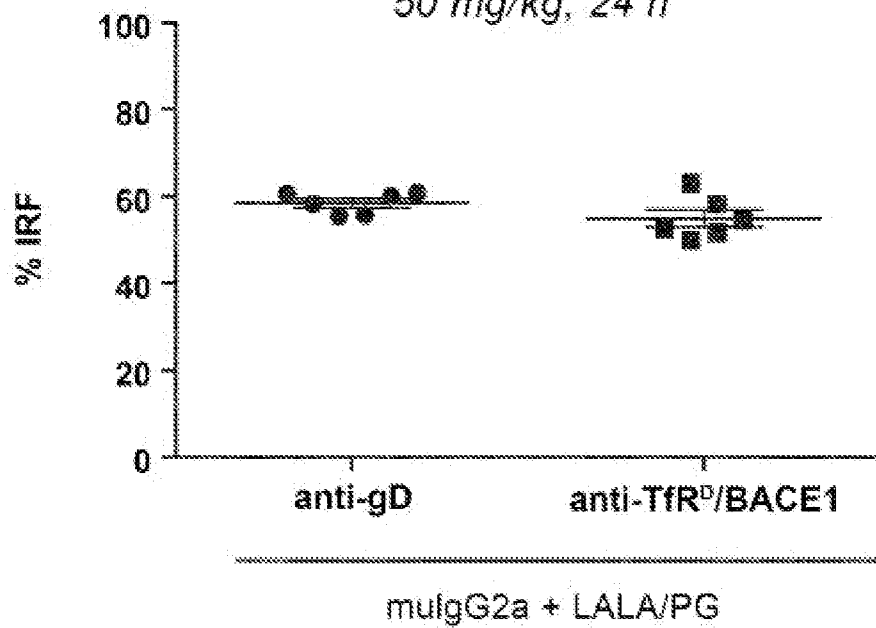


FIG. 21A

13-3558: Reticulocitos totales

50 mg/kg, 24 h

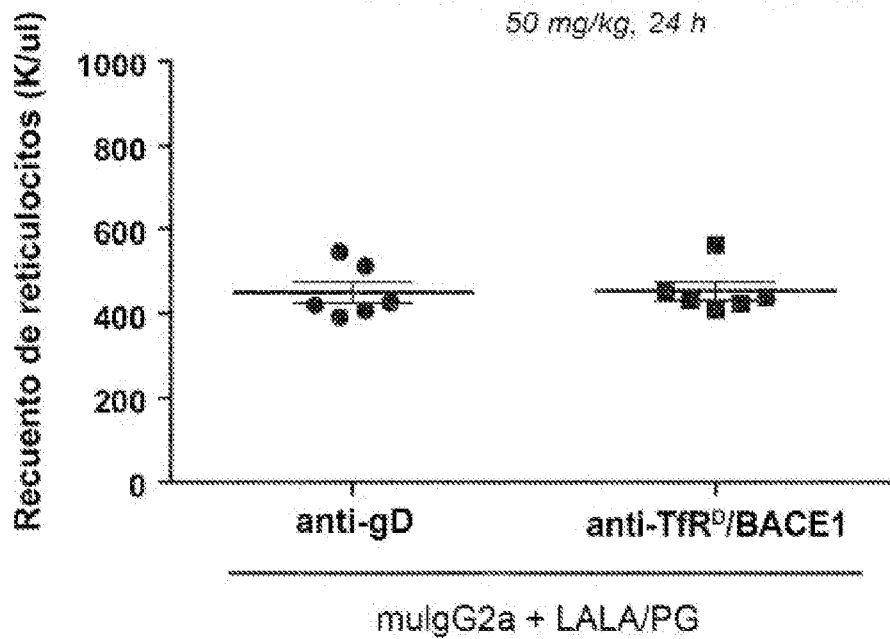
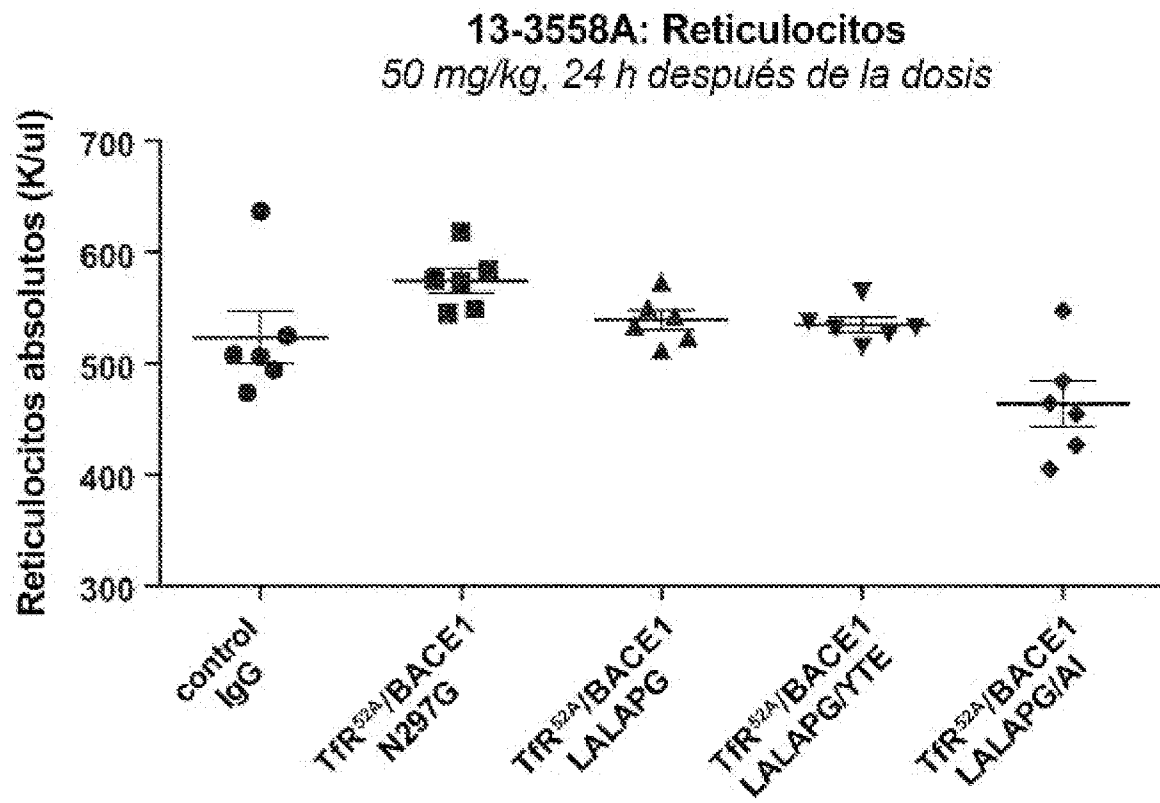
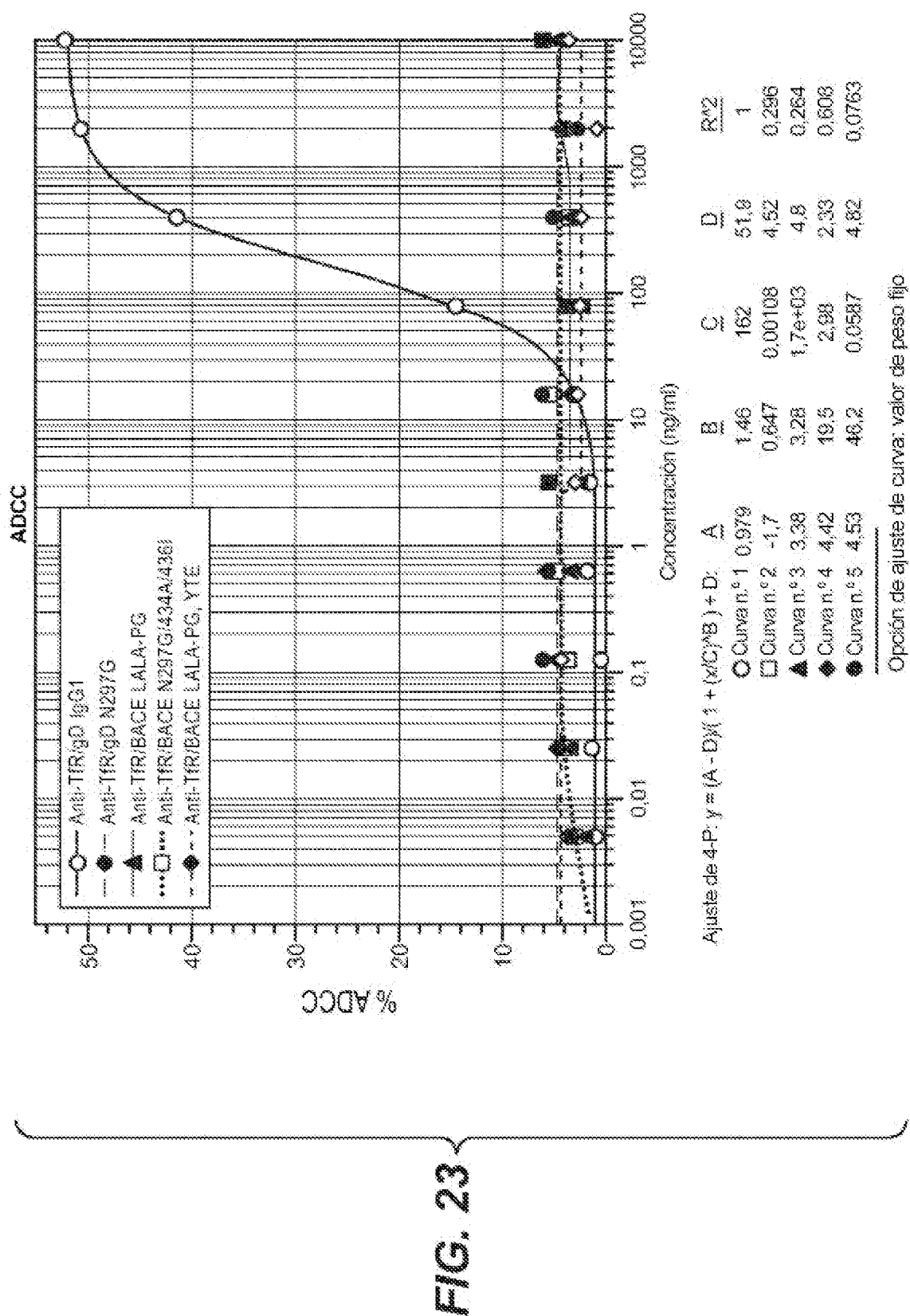


FIG. 21B

**FIG. 22**



Región variable de la cadena ligera

Número de Kabat	CDR L1 - Contacto																																									
	CDR L1 - Chothia																																									
	CDR L1 - Kabat																																									
Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
hu15G11.v5 (TIR1)	D	I	Q	H	C	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	Q	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	K	L	Y	S	M	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	Q	K
hu15G11.52A	D	I	Q	H	C	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	Q	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	K	L	Y	S	M	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	Q	K
hu15G11.53A	D	I	Q	H	C	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	Q	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	K	L	Y	S	M	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	Q	K
hu15G11.92A (TIR2)	D	I	Q	H	C	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	Q	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	K	L	Y	S	M	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	Q	K

Número de Kabat	CDR L2 - Contacto																																									
	CDR L2 - Chothia																																									
	CDR L2 - Kabat																																									
Número de Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
hu15G11.v5 (TIR1)	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	Q	C	V	Z	S	R	F	S	Q	S	Q	S	Q	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	T	A
hu15G11.52A	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	Q	C	V	Z	S	R	F	S	Q	S	Q	S	Q	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	T	A
hu15G11.53A	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	Q	C	V	Z	S	R	F	S	Q	S	Q	S	Q	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	T	A
hu15G11.92A (TIR2)	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	Q	C	V	Z	S	R	F	S	Q	S	Q	S	Q	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	T	A

Número de Kabat	CDR L3 - Contacto																						
	CDR L3 - Chothia																						
	CDR L3 - Kabat																						
85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
hu15G11.v5 (TIR1)	T	T	Y	C	Q	E	F	W	G	T	F	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	D	K
hu15G11.52A	T	T	Y	C	Q	E	F	W	G	T	F	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	D	K
hu15G11.53A	T	Y	Y	C	Q	E	F	W	G	T	F	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	D	K
hu15G11.92A (TIR2)	T	T	Y	C	Q	E	F	W	G	T	F	L	T	P	G	Q	G	T	K	V	E	D	K

FIG. 24A

Región variable de la cadena pesada

Número de Kabat	CDR H1 - Contacto																			
	CDR H1 - Chothia										CDR H1 - Kabat									
hu15G11.45 (TR1)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
hu15G11.52A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
hu15G11.53A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
hu15G11.92A (TR2)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
hu15G11.45 (TR1)	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
hu15G11.52A	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
hu15G11.53A	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
hu15G11.92A (TR2)	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
hu15G11.45 (TR1)	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
hu15G11.52A	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
hu15G11.53A	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
hu15G11.92A (TR2)	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
hu15G11.45 (TR1)	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
hu15G11.52A	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
hu15G11.53A	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
hu15G11.92A (TR2)	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
hu15G11.45 (TR1)	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101
hu15G11.52A	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101
hu15G11.53A	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101
hu15G11.92A (TR2)	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101
hu15G11.45 (TR1)	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
hu15G11.52A	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
hu15G11.53A	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
hu15G11.92A (TR2)	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121

FIG. 24B

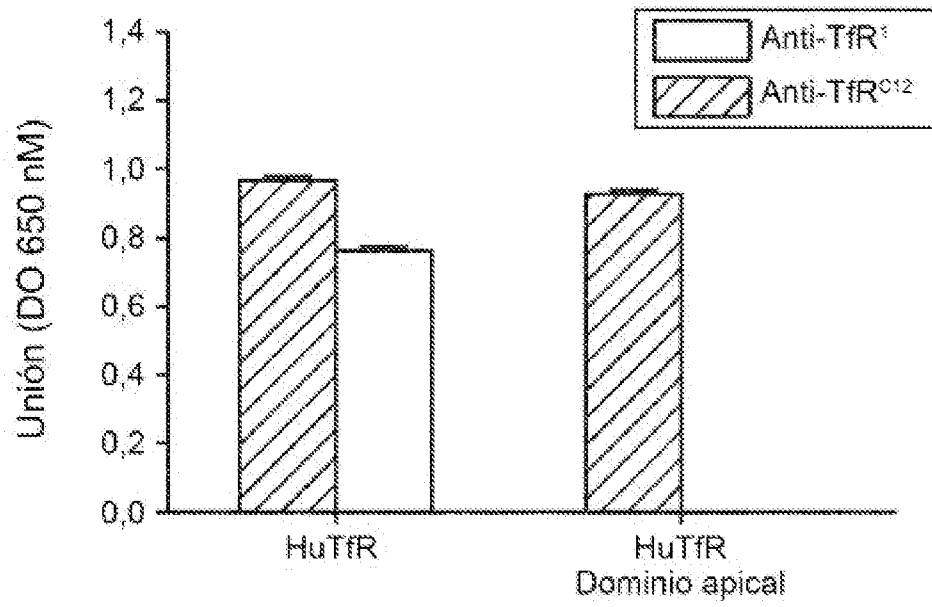


FIG. 25