DESCRIPCIÓN

Título de la invención:

ANTICUERPO ANTI-RECEPTOR DE TRANSFERRINA HUMANA QUE PENETRA LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Campo de la invención

[0001] La presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana a utilizarse para conjugación con un compuesto que necesita exhibir su función en el sistema nervioso central cuando se administra por vía parenteral (una proteína o un compuesto de bajo peso molecular y similares) con el fin de hacer a ese compuesto capaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica después de administrarse por vía parenteral, y también un método para la producción del mismo, así como un método de uso del mismo.

Antecedentes de la invención

[0002] A diferencia de los capilares en otros tejidos, tales como los músculos, los capilares que suministran la sangre a la mayor parte de los tejidos cerebrales, excepto algunas áreas que incluyen los órganos circunventriculares (glándula pineal, glándula pituitaria, área postrema, etc.) difieren en cuanto a que las células endoteliales que forman su endotelio se conectan mutuamente por uniones intercelulares estrechas. La transferencia pasiva de sustancias de los capilares al cerebro se restringe en consecuencia y, aunque hay algunas excepciones, es improbable que las sustancias se muevan hacia el cerebro desde la sangre, excepto por compuestos que son solubles en lípidos o son de bajo peso molecular (de no más de 200 a 500 Dalton) y eléctricamente neutros a alrededor del pH fisiológico. Este sistema, que restringe el

intercambio de sustancias entre la sangre y el fluido tisular del cerebro a través del endotelio de los capilares en el cerebro, se denomina barrera hematoencefálica o BBB. La barrera hematoencefálica no sólo restringe el intercambio de sustancias entre la sangre y el cerebro, sino también entre el fluido tisular del sistema nervioso central, incluyendo el cerebro y la médula espinal, y la sangre.

[0003] Debido a la barrera hematoencefálica, la mayor parte de las células del sistema nervioso central escapan de los efectos de las concentraciones fluctuantes de sustancias tales como hormonas y linfocinas en la sangre, y su homeostasis bioquímica se mantiene de este modo.

[0004] La barrera hematoencefálica, sin embargo, plantea un problema cuando se trata de desarrollar agentes farmacéuticos. Para la mucopolisacaridosis tipo I (síndrome de Hurler), una enfermedad metabólica heredada ocasionada por deficiencia de α-L-iduronidasa, por ejemplo, aunque una terapia de reemplazo enzimático se lleva a cabo por complementación intravenosa con una α-L-iduronidasa recombinante como terapia, la terapia no es efectiva para la notable anormalidad observada en el sistema nervioso central (CNS) en el síndrome de Hurler, dado que la enzima no puede pasar a través de la barrera hematoencefálica.

[0005] El desarrollo de diversos métodos se ha intentado para hacer que esas sustancias macromoleculares tales como proteínas o similares, que necesitan funcionar en el sistema nervioso central, pasen a través de la barrera hematoencefálica. En el caso del factor de crecimiento nervioso, por ejemplo, aunque se han hecho intentos para que un

método dé lugar a que el factor pase a través de la barrera hematoencefálica, al permitir a los liposomas que encapsulan el factor fusionarse con la membrana celular de las células endoteliales en los capilares cerebrales, no se ha alcanzado una aplicación práctica (Literatura sin relación con patentes 1). En el caso de la α-L-iduronidasa, se ha hecho un intento para potenciar la transferencia pasiva de la enzima a través de la barrera hematoencefálica al elevar su concentración sanguínea a través de una sola dosis incrementada de la enzima y, de este modo se ha demostrado, al utilizar un modelo animal de síndrome de Hurler, que la anormalidad en el sistema nervioso central (CNS) mejora por ese método (Literatura sin relación con patentes 2).

[0006] Aún más, eludiendo la barrera hematoencefálica, también se han hecho intentos por administrar una sustancia macromolecular directamente en la cavidad medular o en el cerebro. Por ejemplo, se han emitido informes acerca de un método en el cual la α-L-iduronidasa humana se administró por vía subaracnoidea a un paciente con un síndrome de Hurler (mucopolisacaridosis tipo I) (Literatura de patentes 1), un método en el cual se administró esfingomielinasa ácida humana en los ventrículos cerebrales de un paciente con enfermedad de Niemann-Pick (Literatura de patentes 2), y un método en el cual se administró iduronato 2-sulfatasa (I2S) en los ventrículos cerebrales de animales de modelos con síndrome de Hunter (Literatura de patentes 3). Aunque parece posible, por uno de estos métodos, dejar definitivamente que un agente farmacéutico actúe en el sistema nervioso central, tienen el problema de ser altamente invasivos.

[0007] Se han informado diversos métodos para dejar que una sustancia macromolecular entre al cerebro a través de la barrera hematoencefálica, en los cuales la sustancia macromolecular se modifica para darle una afinidad por proteínas membranales que existen en las células endoteliales de los capilares cerebrales. Los ejemplos de esas proteínas membranales que existen en las células endoteliales de los capilares cerebrales incluyen receptores para compuestos tales como insulina, transferrina, factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I, IGF-II), LDL y leptina.

[0008] Por ejemplo, se ha informado de una técnica en la cual el factor de crecimiento nervioso (NGF) se sintetizó en forma de una proteína de fusión con insulina, y esta proteína de fusión se dejó pasar a través de la barrera hematoencefálica mediante su unión al receptor de insulina (Literaturas de patentes 4 a 6). Más aún, se ha informado de una técnica en la cual el factor de crecimiento nervioso (NGF) se sintetizó en forma de una proteína de fusión con anticuerpo anti-receptor de insulina, y esta proteína de fusión se dejó pasar a través de la barrera hematoencefálica mediante su unión al receptor de insulina (Literaturas de patentes 4 y 7). Más aún, se ha informado de una técnica en la cual el factor de crecimiento nervioso (NGF) se sintetizó en forma de una proteína de fusión con transferrina, y esta proteína de fusión se dejó pasar a través de la barrera hematoencefálica mediante su unión al receptor de transferrina (TfR) (Literatura de patentes 8). Más aún, se ha informado de una técnica en la cual el factor de crecimiento nervioso (NGF) se sintetizó en forma de una proteína de fusión con anticuerpo anti-receptor de transferrina (anticuerpo anti-TfR), y esta proteína de

fusión se dejó pasar a través de la barrera hematoencefálica mediante su unión al TfR (Literaturas de patentes 4 y 9).

[0009] Al inspeccionar además las técnicas que utilizan un anticuerpo anti-receptor de transferrina, se ha informado que, en el campo de la técnica para hacer que un agente farmacéutico pase a través de la barrera hematoencefálica por su unión a un anticuerpo anti-TfR, podría utilizarse un anticuerpo de cadena sencilla (Literatura sin relación con patentes 3). Más aún, se ha informado que los anticuerpos anti-hTfR que exhiben constantes de disociación relativamente altas con hTfR (anticuerpo anti-hTfR de baja afinidad) podrían utilizarse en forma favorable en la técnica para hacer que los agentes farmacéuticos pasen a través de la barrera hematoencefálica (Literaturas de patentes 10 y 11, y Literatura sin relación con patentes 4). Incluso más aún, también se ha informado que un anticuerpo anti-TfR, cuya afinidad por hTfR varía dependiendo del pH, podría emplearse como portador para hacer que los agentes farmacéuticos pasen a través de la barrera hematoencefálica (Literatura de patentes 12 y Literatura sin relación con patentes 5).

Lista de referencias

Literatura de patentes

[0010] Literatura de patentes 1: JP2007-504166 A1
Literatura de patentes 2: JP2009-525963 A1
Literatura de patentes 3: JP2012-62312 A1
Literatura de patentes 4: US5154924 B1
Literatura de patentes 5: JP2011-144178 A1
Literatura de patentes 6: US2004/0101904 A1
Literatura de patentes 7: JP2006-511516 A1

Literatura de patentes 8: JPH06-228199 A1

Literatura de patentes 9: US5977307 B1

Literatura de patentes 10: WO 2012/075037

Literatura de patentes 11: WO 2013/177062

Literatura de patentes 12: WO 2012/143379

Literatura sin relación con patentes

[0011] Literatura sin relación con patentes 1: Xie Y. et al., J Control Release. 105. 106-19 (2005)

Literatura sin relación con patentes 2: Ou L. et al., Mol Genet Metab. 111. 116-22 (2014)

Literatura sin relación con patentes 3: Li JY. Protein Engineering. 12. 787-96 (1999)

Literatura sin relación con patentes 4: Bien-Ly N. et al., J Exp Med. 211. 233-44 (2014)

Literatura sin relación con patentes 5: Sada H. PLoS ONE. 9. E96340 (2014)

Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

[0012] Contra los antecedentes anteriores, un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-TfR que pueda utilizarse para conjugación con un compuesto que necesita exhibir su función en el sistema nervioso central cuando se administra por vía parenteral (una proteína o un compuesto de bajo peso molecular y similares) con el fin de hacer a ese compuesto capaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica, y también un método para la producción del mismo, así como un método de uso del mismo.

Medios para resolver los problemas

[0013] Como resultado de estudios intensos enfocados en el objetivo anterior, los presentes inventores han encontrado que los anticuerpos anti-receptor de transferrina humana (anticuerpos anti-hTfR) que reconocen la región extracelular de hTfR los cuales se obtienen por el método para producción de anticuerpos descrito con detalle en la especificación, pasan con eficiencia a través de la barrera hematoencefálica cuando se administran al cuerpo, y han consumado la presente invención por consiguiente. De este modo, la presente invención proporciona lo siguiente:

[0014] 1. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en (1) a (14) a continuación:

(1) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o la secuencia de aminoácidos Trp-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 en CDR3;

(2) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 en CDR3;

(3) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17 en

CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o la secuencia de aminoácidos Lys-Val-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 en CDR3;

(4) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 en CDR3;

(5) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 en CDR3;

(6) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 en CDR3;

(7) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39 o la secuencia de aminoácidos Gln-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 en CDR3;

(8) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 o

SEQ ID NO: 44 o la secuencia de aminoácidos Gly-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 en CDR3;

(9) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 49 o la secuencia de aminoácidos Phe-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 en CDR3;

(10) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 en CDR3;

(11) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 57 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 60 en CDR3;

(12) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64 o la secuencia de aminoácidos Trp-Ser-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 65 en CDR3;

(13) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser en CDR2, y

la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70 en CDR3; y

(14) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 o SEQ ID NO: 74 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 en CDR3.

2. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con 1 arriba citado, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en (1) a (14) a continuación:

(1) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 en CDR3;

(2) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 13 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 en CDR3;

(3) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 en CDR3;

(4) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 en CDR2, y la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 en CDR3;

(5) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 en CDR3;

(6) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 en CDR3;

(7) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 en CDR3;

(8) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 en CDR3;

(9) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 en CDR3;

(10) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 en CDR3;

(11) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 60 en CDR3;

(12) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 65 en CDR3;

(13) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70 en CDR3; y

(14) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 en CDR3.

3. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, en la región variable de cadena ligera del mismo, tienen una homología no menor a 80% con las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en la cadena ligera, de acuerdo con 1 o 2 arriba citados.

4. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, en la región variable de cadena ligera del mismo, tienen una homología no menor a 90% con las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en la cadena ligera, de acuerdo con 1 o 2 arriba

citados.

5. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 5 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una de las CDR en la cadena ligera, de acuerdo con 1 o 2 arriba citados.

6. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una de las CDR en la cadena ligera, de acuerdo con 1 o 2 arriba citados.

7. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en (1) a (14) a continuación:

(1) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80 o SEQ ID NO: 81 en CDR3;

(2) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 85 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 87 en CDR3;

(3) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 89 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 o

SEQ ID NO: 91 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 93 en CDR3;

(4) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 95 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 o SEQ ID NO: 99 en CDR3;

(5) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 o SEQ ID NO: 101 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 103 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 105 en CDR3;

(6) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 107 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 108 o SEQ ID NO: 278 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 110 en CDR3;

(7) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 112 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 114 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 116 en CDR3;

(8) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 118 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 279 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida

como SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 121 en CDR3;

(9) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 o SEQ ID NO: 125 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 o SEQ ID NO: 127 en CDR3;

(10) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 132 o SEQ ID NO: 133 en CDR3;

(11) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 o SEQ ID NO: 135 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 136 o SEQ ID NO: 137 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 o SEQ ID NO: 139 en CDR3;

(12) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 o SEQ ID NO: 145 en CDR3;

(13) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 147 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 149 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 150 o SEQ ID NO: 151 en CDR3; y

(14) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 o SEQ ID NO: 153 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 o SEQ ID NO: 155 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 o SEQ ID NO: 157 en CDR3.

8. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con 7 arriba citado, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en (1) a (14) a continuación:

(1) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80 en CDR3;

(2) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 en CDR3;

(3) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 en CDR3;

(4) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 96 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 en CDR3;

(5) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 104 en CDR3;

(6) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 108 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 en CDR3;

(7) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 como CDR3;

(8) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 120 en CDR3;

(9) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 en CDR3;

(10) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 132 en CDR3;

(11) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 en CDR1, la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 136 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 en CDR3;

(12) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 en CDR3;

(13) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 150 en CDR3; y

(14) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 en CDR3.

9. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, en la región variable de cadena pesada del mismo, tienen una homología no menor a 80% con las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en la cadena pesada, de acuerdo con 7 u 8 arriba citados.

10. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, en la región variable de cadena pesada del mismo, tienen una homología no menor a 90% con las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en la cadena pesada, de acuerdo con 7 u 8 arriba citados.

11. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 5 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una de las CDR en la cadena pesada, de acuerdo con 7 u 8 arriba citados.

12. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una de las CDR en la cadena pesada, de acuerdo con 7 u 8 arriba citados.

13. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del mismo se seleccionan de entre el grupo que consiste en (1) a (14) arriba citados:

(1) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o la secuencia de aminoácidos Trp-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80 o SEQ ID NO: 81 como CDR3;

(2) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ

ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 85 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 87 como CDR3;

(3) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, o la secuencia de aminoácidos Lys-Val-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 89 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 91 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 93 como CDR3;

(4) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94

o SEQ ID NO: 95 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 o SEQ ID NO: 99 como CDR3;

(5) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 o SEQ ID NO: 101 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 103 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 105 como CDR3;

(6) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 107 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 108 o SEQ ID NO: 278 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 110 como CDR3;

(7) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39 o la secuencia de aminoácidos Gln-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 112 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 114 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 116 como CDR3;

(8) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44 o la secuencia de aminoácidos Gly-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 118 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 279 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 121 como CDR3;

(9) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 49 o la secuencia de aminoácidos

Phe-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 o SEQ ID NO: 125 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 o SEQ ID NO: 127 como CDR3;

(10) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 132 o SEQ ID NO: 133 como CDR3;

(11) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 57 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 60 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 o SEQ ID NO: 135 como CDR1, la secuencia de aminoácidos

definida como SEQ ID NO: 136 o SEQ ID NO: 137 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 o SEQ ID NO: 139 como CDR3;

(12) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64 o la secuencia de aminoácidos Trp-Ser-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 65 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 o SEQ ID NO: 145 como CDR3;

(13) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 147 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 149 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 150 o SEQ ID NO: 151 como CDR3; y

(14) la región variable de cadena ligera que comprende la

secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 o SEQ ID NO: 74 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 o SEQ ID NO: 153 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 o SEQ ID NO: 155 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 o SEQ ID NO: 157 como CDR3.

14. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con 13 arriba citado, en donde la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del mismo se seleccionan de entre el grupo que consiste en (1) a (14) arriba citados:

(1) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80 como CDR3;

(2) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 13 como

CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 como CDR3;

(3) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 como CDR3;

(4) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 96 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 como CDR3;

(5) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 como CDR1,

la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 104 como CDR3;

(6) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 108 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 como CDR3;

(7) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 como CDR3;

(8) la región variable de cadena ligera que comprende la

secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 120 como CDR3;

(9) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 como CDR3;

(10) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 132 como CDR3;

(11) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 60 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 136 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 como CDR3;

(12) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 65 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 como CDR3;

(13) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID

NO: 150 como CDR3; y

(14) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 como CDR3.

15. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la secuencia de aminoácidos de cada una de CDR1, CDR2 y CDR3, en la cadena ligera y la cadena pesada del mismo, tiene una homología no menor a 80% con la secuencia de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de una de las combinaciones de la cadena ligera y la cadena pesada, de acuerdo con 13 o 14 arriba citados.

16. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la secuencia de aminoácidos de cada una de CDR1, CDR2 y CDR3, en la cadena ligera y la cadena pesada del mismo, tiene una homología no menor a 90% con la secuencia de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de una de las combinaciones de la cadena ligera y la cadena pesada, de acuerdo con 13 o 14 arriba citados.

17. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 5 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una CDR en cada una de la cadena ligera y la cadena pesada de una de las

combinaciones de la cadena ligera y la cadena pesada, de acuerdo con 13 o 14 arriba citados.

18. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una CDR en cada una de la cadena ligera y la cadena pesada de una de las combinaciones de la cadena ligera y la cadena pesada, de acuerdo con 13 o 14 arriba citados.

19. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la región variable de cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 y SEQ ID NO: 163, y en donde la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 y SEQ ID NO: 171.

20. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la región variable de cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 y SEQ ID NO: 179, y en donde la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos

definidas como SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 y SEQ ID NO: 187.

21. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la región variable de cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 y SEQ ID NO: 195, y en donde la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 y SEQ ID NO: 209.

22. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana seleccionado de entre el grupo que consiste en (1) a (6) a continuación:

(1) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 163, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 171,

(2) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 179, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 187,

(3) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ

ID NO: 191, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205,

(4) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 193, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205,

(5) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 194, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205, y

(6) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 195, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205.

23. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana seleccionado de entre el grupo que consiste en (1) a (10) a continuación:

(1) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 164; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 172,

(2) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO:

180; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 188,

(3) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210,

(4) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 198; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210,

(5) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 200; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210,

(6) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 202; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210,

(7) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212,

(8) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 198; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212,

(9) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 200; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212, y

(10) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 202; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212.

24. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana que tiene una homología no menor a 80% con el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 19 a 23 arriba citados, para la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada.

25. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana que tiene una homología no menor a 90% con el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 19 a 23 arriba citados, para la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada.

26. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 10 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 19 a 23 arriba citados.

27. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en

donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 19 a 23 arriba citados.

28. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 10 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 19 a 23 arriba citados.

29. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 19 a 23 arriba citados.

30. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 10 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con las secuencias de aminoácidos respectivas que forman la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 19 a 23 arriba citados.

31. Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con las secuencias de aminoácidos respectivas que forman la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 19 a 23 arriba citados.

32. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 31 arriba citados, en donde el anticuerpo tiene una afinidad tanto por la región extracelular del receptor de transferrina humana como la región extracelular del receptor de transferrina de mono.

33. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con 32 arriba citado, en donde la constante de disociación de su complejo con la región extracelular del receptor de transferrina humana no es mayor a 1×10^{-8} M, y la constante de disociación de su complejo con la región extracelular del receptor de transferrina de mono no es mayor a 5×10^{-8} M.

34. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 33 arriba citados, en donde el anticuerpo es anticuerpo Fab, anticuerpo $F(ab')_2$ o anticuerpo F(ab').

35. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 33 arriba citados, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla seleccionado de entre el grupo que consiste en scFab, scF(ab'), $scF(ab')_2$ y scFv.

36. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con 35 arriba citado, en donde la cadena ligera y la cadena pesada del mismo se enlazan mediante una secuencia enlazadora.

37. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con 35 arriba citado, en donde la cadena pesada se enlaza, mediante una secuencia enlazadora, a la cadena ligera en el lado C terminal de la misma.

38. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de

acuerdo con 35 arriba citado, en donde la cadena ligera se enlaza, mediante una secuencia enlazadora, a la cadena pesada en el lado C terminal de la misma.

39. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 36 a 38 arriba citados, en donde la secuencia enlazadora consiste en 8 a 50 residuos de aminoácidos.

40. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con 39 arriba citado, en donde la secuencia enlazadora se selecciona de entre el grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos que consiste en tres secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente, cada una definida como SEQ ID NO: 3.

41. Una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 40 arriba citados, y la secuencia de aminoácidos de una proteína diferente (A) enlazada a la cadena ligera del anticuerpo en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

42. Una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana y una proteína diferente (A),

en donde el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana es el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 40 arriba citados, y

en donde la proteína diferente (A) se enlaza a la cadena ligera

del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

43. La proteína de fusión de acuerdo con 41 o 42 arriba citados, en donde la proteína diferente (A) se enlaza, mediante una secuencia enlazadora, a la cadena ligera en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

44. La proteína de fusión de acuerdo con 43 arriba citado, en donde la secuencia enlazadora consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos.

45. La proteína de fusión de acuerdo con 44 arriba citado, en donde la secuencia enlazadora comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en una sola glicina, una sola serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 5, y las secuencias de aminoácidos que consisten en 1 a 10 de las mismas que se enlazan consecutivamente.

46. Una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 40 arriba citados, y la secuencia de aminoácidos de una proteína diferente (A) enlazada a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

47. Una proteína de fusión de un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana y una proteína diferente (A),

en donde el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana es el

anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 40 arriba citados, y

en donde la proteína diferente (A) se enlaza a la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

48. La proteína de fusión de acuerdo con 46 o 47 arriba citados, en donde la proteína diferente (A) se enlaza, mediante una secuencia enlazadora, a la cadena pesada en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

49. La proteína de fusión de acuerdo con 48 arriba citado, en donde la secuencia enlazadora consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos.

50. La proteína de fusión de acuerdo con 48 arriba citado, en donde la secuencia enlazadora comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en una sola glicina, una sola serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 5, y las secuencias de aminoácidos que consisten en 1 a 10 de las mismas que se enlazan consecutivamente.

51. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 41 a 50 arriba citados, en donde la proteína diferente (A) es una proteína que se origina de humano.

52. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 41 a 51 arriba citados, en donde la proteína diferente (A) se selecciona de

entre el grupo que consiste en factor de crecimiento nervioso (NGF), enzimas lisosómicas, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF), neurotrofina 3, neurotrofina 4/5, neurotrofina 6, neuregulina 1, eritropoyetina, darbepoyetina, activina, factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interferón α, interferón β, interferón γ, interleucina 6, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), citocinas, receptor del factor de necrosis tumoral α (receptor de TNF-α), ligandos de PD-1, enzimas que tienen actividad de degradación de amiloides β, anticuerpo anti-amiloide β, anticuerpo anti-BACE, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-TNF-α y otros anticuerpos medicinales.

53. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 41 a 51 arriba citados, en donde la proteína diferente (A) es una enzima lisosómica, y en donde la enzima lisosómica se selecciona de entre el grupo que consiste en α-L-iduronidasa, iduronato 2-sulfatasa, glucocerebrosidasa, β-galactosidasa, proteína activadora de GM2, β-hexosaminidasa A, β-hexosaminidasa B, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, α-manosidasa, β-manosidasa, galactosilceramidasa, saposina C, arilsulfatasa A, α-L-fucosidasa, aspartilglucosaminidasa, α-N-acetilgalactosaminidasa, esfingomielinasa ácida, α-galactosidasa A, β-glucuronidasa, heparán N-sulfatasa,

α-N-acetilglucosaminidasa, acetil CoA:α-glucosaminida N-acetiltransferasa, N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, ceramidasa ácida, amilo-1,6-glucosidasa, sialidasa, palmitoil proteína tioesterasa 1, tripeptidil-peptidasa 1, hialuronidasa 1, CLN1 y CLN2.

54. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 41 a 51 arriba citados, en donde la proteína diferente (A) es iduronato 2-sulfatasa.

55. La proteína de fusión de acuerdo con 50 arriba citado, en donde la proteína diferente (A) es iduronato 2-sulfatasa humana, y en donde la proteína de fusión se selecciona de entre (1) a (3) a continuación:

(1) la proteína de fusión, en donde la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 164, y en donde la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana, y la cadena pesada enlazada completa tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 247.

(2) la proteína de fusión, en donde la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 180, y en donde la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana, y la cadena pesada enlazada completa tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 249, y

(3) la proteína de fusión, en donde la cadena ligera del

anticuerpo anti-hTfR humanizado tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196, y en donde la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana, y la cadena pesada enlazada completa tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 251.

56. La proteína de fusión de acuerdo con 50 arriba citado, en donde la proteína diferente (A) es iduronato 2-sulfatasa humana, y en donde la proteína de fusión se selecciona de entre (1) a (3) a continuación:

(1) la proteína de fusión que comprende: la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 164; y la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 172 que se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana definida como SEQ ID NO: 246;

(2) la proteína de fusión que comprende: la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 180; y la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 188 que se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana definida como SEQ ID NO: 246;

(3) la proteína de fusión que comprende: la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de

aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196; y la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 que se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana definida como SEQ ID NO: 246.

57. La proteína de fusión de acuerdo con 50 arriba citado, en donde la proteína diferente (A) es iduronato 2-sulfatasa humana, y en donde la proteína de fusión se selecciona de entre (1) a (3) a continuación:

(1) la proteína de fusión que comprende: la iduronato 2-sulfatasa humana enlazada mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser a la cadena pesada en el lado C terminal de la misma; y la cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 247, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la proteína de fusión que comprende: la iduronato 2-sulfatasa humana enlazada mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser a la cadena pesada en el lado C terminal de la misma; y la cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 249, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 180, y

(3) la proteína de fusión que comprende: la iduronato 2-sulfatasa humana enlazada mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser a la cadena pesada en el lado C terminal de la misma; y la cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 251, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como

SEQ ID NO: 196.

58. Un fragmento de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 40 arriba citados.

59. Un fragmento de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 41 a 57 arriba citados.

60. Un vector de expresión que comprende el fragmento de DNA de acuerdo con 58 o 59 arriba citados, que se incorpora en el mismo.

61. Una célula de mamífero transformada con el vector de expresión de acuerdo con 60 arriba citado.

62. Un complejo anticuerpo anti-receptor de transferrina humana-compuesto farmacológicamente activo, en donde la cadena ligera y/o la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 1 a 40 arriba citados, se enlaza a un compuesto farmacológicamente activo de bajo peso molecular que necesita dejarse pasar a través de la barrera hematoencefálica y exhibir la función del mismo en el cerebro.

63. El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con 62 arriba citado, en donde el compuesto farmacológicamente activo se selecciona de entre el grupo que consiste en fármaco anticanceroso, agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer, agente terapéutico para la enfermedad de Parkinson, agente terapéutico para la enfermedad de Huntington, agente terapéutico para esquizofrenia, antidepresivo, agente terapéutico para esclerosis múltiple,

agente terapéutico para esclerosis lateral amiotrófica, agente terapéutico para tumores del sistema nervioso central incluyendo tumor cerebral, agente terapéutico para la enfermedad de almacenamiento lisosómico acompañada de encefalopatía, agente terapéutico para glucogenosis, agente terapéutico para distrofia muscular, agente terapéutico para isquemia cerebral, agente terapéutico para enfermedades por priones, agente terapéutico para los trastornos traumáticos del sistema nervioso central, agente terapéutico para enfermedades virales y bacterianas del sistema nervioso central, agente farmacéutico utilizado para recuperación después de cirugía cerebral, agente farmacéutico utilizado para recuperación después de cirugía de médula espinal, siRNA, ADN antisentido y péptido.

64. El uso del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 40 arriba citados, para permitir a la proteína diferente (A), o un compuesto farmacológicamente activo de bajo peso molecular, pasar a través de la barrera hematoencefálica y exhibir la función del mismo en el cerebro.

65. El uso del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 40 arriba citados, para la elaboración de un medicamento para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central, al enlazar al mismo la molécula de una proteína fisiológicamente activa o un compuesto de bajo peso molecular farmacológicamente activo para la condición patológica.

66. Un método para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso central, que comprende administrar por vía parenteral,

a un paciente con el trastorno, una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína fisiológicamente activa o compuesto de bajo peso molecular farmacológicamente activo para el trastorno, en forma de un conjugado con la molécula del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de 1 a 40 arriba citados.

67. El uso del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 54 a 57 arriba citados, para hacer que la iduronato 2-sulfatasa humana pase a través de la barrera hematoencefálica y exhiba la función de la misma en el cerebro.

68. El uso de la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 54 a 57 para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña al síndrome de Hunter.

69. Un método para el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central que acompaña al síndrome de Hunter, que comprende administrar por vía parenteral una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión, de acuerdo con cualquiera de 54 a 57 arriba citados, a un paciente con la enfermedad.

Efectos de la invención

[0015] Por la presente invención, diversos compuestos tales como proteínas y compuestos de bajo peso molecular que, aunque son fisiológica o farmacológicamente activos, han sido inutilizables por administración parenteral a causa de su poca o ninguna capacidad para pasar a través de la barrera hematoencefálica, pueden proporcionarse en la forma que les permite pasar a través de la barrera hematoencefálica,

haciéndolos de este modo nuevos agentes farmacéuticos para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central.

Breve descripción de los dibujos

[0016] Figura 1. Fotografías sustitutas para dibujos que muestran el resultado de la tinción inmunohistoquímica del anticuerpo anti-hTfR en la corteza cerebral de un macaco cangrejero después de una sola administración intravenosa del anticuerpo anti-hTfR. (a) anticuerpo anti-hTfR no administrado, (b) anticuerpo anti-hTfR No. 1 administrado, (c) anticuerpo anti-hTfR No. 2 administrado, (d) anticuerpo anti-hTfR No. 3 administrado. La barra en el lado inferior derecho en cada fotografía es un indicador de 50 μm.

Figura 2. Figura que muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica del anticuerpo anti-hTfR en el hipocampo de un macaco cangrejero después de una sola administración intravenosa del anticuerpo anti-hTfR. (a) anticuerpo anti-hTfR no administrado, (b) anticuerpo anti-hTfR No. 1 administrado, (c) anticuerpo anti-hTfR No. 2 administrado, (d) anticuerpo anti-hTfR No. 3 administrado. La barra en el lado inferior derecho en cada fotografía es un indicador de 50 μm.

Figura 3. Fotografías sustitutas para dibujos que muestran el resultado de la tinción inmunohistoquímica del anticuerpo anti-hTfR en el cerebelo de un macaco cangrejero después de una sola administración intravenosa del anticuerpo anti-hTfR. (a) anticuerpo anti-hTfR no administrado, (b) anticuerpo anti-hTfR No. 1 administrado, (c) anticuerpo anti-hTfR No. 2 administrado, (d) anticuerpo anti-hTfR No. 3 administrado. La barra en el lado inferior derecho en cada fotografía

es un indicador de 50 μm.

Figura 4. Figura que muestra la cantidad de un anticuerpo anti-hTfR humanizado acumulado en diversos órganos diferentes al cerebro de un macaco cangrejero después de una sola administración intravenosa. El eje vertical indica la cantidad del anticuerpo anti-hTfR humanizado (μg/g de peso húmedo) en peso húmedo de cada órgano. Las barras blancas representan, desde la izquierda, la cantidad acumulada en cada órgano del mono después de la administración del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4), y anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4), respectivamente, y las barras negras representan la cantidad acumulada en órganos respectivos del mono después de la administración de trastuzumab (Herceptin™). "ND" denota "no detectado".

Figura 5. Fotografías sustitutas para dibujos que muestran el resultado de la tinción inmunohistoquímica de un anticuerpo anti-hTfR humanizado en la corteza cerebral de un macaco cangrejero después de una sola administración intravenosa. (a) Herceptin® administrado, (b) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 administrado, (c) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 administrado, (d) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) administrado, (e) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4) administrado. La barra en el lado inferior derecho en cada fotografía es un indicador de 20 μm.

Figura 6. Fotografías sustitutas para dibujos que muestran el resultado de la tinción inmunohistoquímica de un anticuerpo anti-hTfR humanizado en el hipocampo de un macaco cangrejero después de una

sola administración intravenosa. (a) Herceptin® administrado, (b) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 administrado, (c) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 administrado, (d) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) administrado, (e) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4) administrado. La barra en el lado inferior derecho en cada fotografía es un indicador de 20 μm.

Figura 7. Figura que muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica del anticuerpo anti-hTfR humanizado en el cerebelo de un macaco cangrejero después de una sola administración intravenosa. (a) Herceptin® administrado, (b) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 administrado, (c) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 administrado, (d) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) administrado, (e) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4) administrado. La barra en el lado inferior derecho en cada fotografía es un indicador de 20 μm.

Figura 8. Figura que muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica del anticuerpo anti-hTfR humanizado en la médula oblonga de un macaco cangrejero después de una sola administración intravenosa. (a) Herceptin® administrado, (b) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 administrado, (c) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 administrado, (d) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) administrado, (e) anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4) administrado. La barra en el lado inferior derecho en cada fotografía es un indicador de 20 μm.

Figura 9. Figura que muestra la cantidad de I2S-anticuerpo anti-hTfR y rhI2S acumuladas en los tejidos cerebrales de un macaco

cangrejero después de una sola administración intravenosa. El eje vertical indica la cantidad de I2S-anticuerpo anti-hTfR y rhI2S en peso húmedo de los tejidos cerebrales (µg/g de peso húmedo). Las barras punteadas representan la cantidad de rhI2S acumulada en los tejidos cerebrales del macaco cangrejero. Las barras a rayas representan la cantidad de la I2S-anticuerpo anti-hTfR acumulada en los tejidos cerebrales del macaco cangrejero. El segmento de línea vertical indica la desviación estándar.

Figura 10. Gráficas que muestran la cantidad del glucosaminoglicano (GAG) en diversos órganos de un ratón con inactivación del gen de I2S (ratón I2S-KO) inyectado por vía intravenosa con un anticuerpo anti-hTfR humanizado o rhI2S. (a) cerebro, (b) hígado, (c) pulmón, (d) corazón. Para cada gráfica, las barras representan, desde la izquierda, ratón tipo silvestre (WT), grupo de control (grupo sin administración), grupo con administración de 0.5 mg/kg, grupo con administración de 1.0 mg/kg y grupo con administración de 2.0 mg/kg. El eje vertical indica la cantidad de GAG del peso seco de cada órgano (µg/g de peso seco). Los segmentos de línea vertical indican la desviación estándar, y "**" indica $p < 0.01$ en comparación con el grupo de control de acuerdo con la prueba de Dunnett.

Modalidades para llevar a cabo la invención

[0017] En la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere principalmente a un anticuerpo humano, anticuerpo de ratón, anticuerpo humanizado, así como un anticuerpo quimérico entre un anticuerpo humano y un anticuerpo de mamífero no humano, y un anticuerpo

quimérico entre un anticuerpo de ratón y un anticuerpo de mamífero diferente a ratón, pero el significado del término no se limita a ellos en la medida en que una sustancia de interés tenga una propiedad para unirse específicamente a cierto antígeno, y tampoco hay una limitación específica en lo que se refiere a la especie animal del anticuerpo.

[0018] En la presente invención, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo cuya proteína completa se codifica por un gen que se origina del humano. El término "anticuerpo humano", sin embargo, también incluye un anticuerpo codificado por un gen obtenido al introducir una mutación en un gen humano original con el propósito de potenciar la eficiencia de expresión del gen, por ejemplo, sin modificar la secuencia de aminoácidos original. El término "anticuerpo humano" también incluye un anticuerpo que es obtenible a través de la combinación de dos o más genes que codifican anticuerpos humanos al reemplazar cierta parte de un anticuerpo humano con una parte de otro anticuerpo humano. Un anticuerpo humano incluye tres regiones determinantes de la complementariedad (abreviado CDR) en la cadena ligera de la inmunoglobulina, y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en la cadena pesada de la inmunoglobulina. Las tres CDR en la cadena ligera de la inmunoglobulina se denominan, a partir del lado N terminal, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las tres CDR en la cadena pesada de la inmunoglobulina también se denominan, a partir del lado N terminal, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. El término "anticuerpo humano" también incluye un anticuerpo humano producido al reemplazar una CDR de un anticuerpo humano con una CDR de otro anticuerpo humano para modificar

propiedades tales como la especificidad antigénica y la afinidad de los anticuerpos humanos originales, etc.

[0019] En la presente invención, el término “anticuerpo humano” también incluye un anticuerpo que se produce a través de la modificación del gen del anticuerpo humano original, al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición, a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original. Cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original con otros aminoácidos, el número de aminoácidos reemplazados de preferencia puede ser de 1 a 20, de más preferencia 1 a 5, y aún de más preferencia 1 a 3. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original, el número de aminoácidos eliminados de preferencia puede ser de 1 a 20, de más preferencia 1 a 5, y aún de más preferencia 1 a 3. Un anticuerpo producido por una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos también es un “anticuerpo humano”. En algunos casos, uno o más aminoácidos, de preferencia 1 a 20, de más preferencia 1 a 5, y aún de más preferencia 1 a 3 aminoácidos, pueden adicionarse dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original o en su lado N o C terminal. Un anticuerpo producido por una mutación combinada de adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también es un “anticuerpo humano”. La secuencia de aminoácidos de este anticuerpo mutado tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, aún de más preferencia no menor a 95%, e incluso de más preferencia no menor a 98% con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original.

De este modo, en la presente invención, el término “gen que se origina del humano” incluye no sólo el gen sin mutaciones que se origina del humano, sino también un gen producido al modificarlo.

[0020] La homología entre la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo sin mutaciones y la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo producido al introducir una mutación en el mismo puede calcularse fácilmente al utilizar algoritmos de cálculo de homología reconocidos. Como estos algoritmos existen, por ejemplo, BLAST (Altschul SF. J Mol. Biol. 215. 403-10 (1990)), una búsqueda de similitudes por Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85. 2444 (1988)), y el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2. 482-9 (1981)), y similares.

[0021] El término “anticuerpo de ratón” se refiere a un anticuerpo cuya proteína completa consiste en una secuencia de aminoácidos que es la misma que un anticuerpo codificado por un gen que se origina de un ratón. Por lo tanto, el término “anticuerpo de ratón” también incluye un anticuerpo que se codifica por un gen producido al introducir una mutación en el gen de ratón original sin ocasionar un cambio en su secuencia de aminoácidos sino, por ejemplo, con el fin de mejorar la eficiencia de expresión del gen. Más aún, el término “anticuerpo de ratón” también incluye un anticuerpo producido a través de la combinación de dos o más genes que codifican anticuerpos de ratón al reemplazar una parte de un anticuerpo de ratón con una parte de otro anticuerpo de ratón. Un anticuerpo de ratón tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en la cadena ligera de la inmunoglobulina, y tres regiones determinantes de la

complementariedad (CDR) en la cadena pesada de la inmunoglobulina. Las tres CDR en la cadena ligera de la inmunoglobulina se denominan, a partir del lado N terminal, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las tres CDR en la cadena pesada de la inmunoglobulina también se denominan, a partir del lado N terminal, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. El término "anticuerpo de ratón" también incluye un anticuerpo producido al reemplazar una CDR de un anticuerpo de ratón con una CDR de otro anticuerpo de ratón para modificar la especificidad y afinidad de los anticuerpos de ratón originales.

[0022] En la presente invención, el término "anticuerpo de ratón" también incluye un anticuerpo que se produce a través de la modificación del gen del anticuerpo de ratón original, al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición, a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original. Cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original con otros aminoácidos, el número de aminoácidos reemplazados de preferencia puede ser de 1 a 20, de más preferencia 1 a 5, y aún de más preferencia 1 a 3. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original, el número de aminoácidos eliminados de preferencia puede ser de 1 a 20, de más preferencia 1 a 5, y aún de más preferencia 1 a 3. Un anticuerpo producido por una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos también es un "anticuerpo de ratón". Cuando se adiciona uno o más aminoácidos, pueden adicionarse dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original o en su lado N o C terminal, de preferencia 1 a 20, de más preferencia 1 a 5, y aún de

más preferencia 1 a 3 en total. Un anticuerpo producido por una mutación combinada de adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también es un "anticuerpo de ratón". La secuencia de aminoácidos de este anticuerpo mutado tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, aún de más preferencia no menor a 95%, e incluso de más preferencia no menor a 98% con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original. De este modo, en la presente invención, el término "gen que se origina de ratón" incluye no sólo el gen sin mutaciones que se origina de ratón, sino también un gen producido al modificarlo.

[0023] En la presente invención, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en el cual parte de la secuencia de aminoácidos de su región variable (por ejemplo, especialmente la totalidad o parte de sus CDR) se origina de un mamífero no humano, mientras el resto se origina del humano. Un ejemplo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo producido al reemplazar las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena ligera de la inmunoglobulina y las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que constituyen un anticuerpo humano, con las CDR de un mamífero no humano. En la medida en que se origine de un mamífero no humano, no hay limitación particular en lo que se refiere a la especie biológica de la cual se originan aquellas CDR que se injertan en una posición apropiada del anticuerpo humano, si bien se prefieren ratón, rata, conejo, caballo o primate no humano, se prefieren más ratón y rata, y ratón, por ejemplo.

[0024] En la presente invención, el término “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo producido al conectar fragmentos de dos o más anticuerpos diferentes que se originan de dos o más especies diferentes.

[0025] Un anticuerpo quimérico, entre un anticuerpo humano y un anticuerpo de mamífero no humano, es un anticuerpo proporcionado al reemplazar parte de un anticuerpo humano con parte de un anticuerpo de mamífero no humano. Como se explica a continuación, un anticuerpo se produce de una región Fc, una región Fab y una región de la bisagra. Un ejemplo específico de estos anticuerpos quiméricos es un anticuerpo quimérico cuya región Fc se origina de un anticuerpo humano, mientras su región Fab se origina de un anticuerpo de mamífero no humano. La región de la bisagra se origina ya sea de un anticuerpo humano o de un anticuerpo de mamífero no humano. Por el contrario, el término anticuerpo quimérico también incluye uno cuya región Fc se origina de un anticuerpo de mamífero no humano, mientras su región Fab se origina de un anticuerpo humano. En tal caso también, la región de la bisagra puede originarse ya sea de un anticuerpo humano o de un anticuerpo de mamífero no humano. Por el contrario, un anticuerpo quimérico también se incluye como ejemplo, cuya región Fc se origina de un anticuerpo de mamífero no humano, mientras su región Fab se origina de un anticuerpo humano. En este caso también, la región de la bisagra puede originarse ya sea de un anticuerpo humano o de un anticuerpo de mamífero no humano.

[0026] Un anticuerpo puede visualizarse compuesto de una región variable y una región constante. Ejemplos adicionales de anticuerpos quiméricos incluyen un anticuerpo en el cual la región constante de

cadena pesada (C_H) y la región constante de cadena ligera (C_l) se originan de un anticuerpo humano, mientras la región variable de cadena pesada (V_H) y la región variable de cadena ligera (V_L) se originan de un anticuerpo de un mamífero no humano y, por el contrario, un anticuerpo en el cual la región constante de cadena pesada (C_H) y la región constante de cadena ligera (C_l) se originan de un anticuerpo de un mamífero no humano, mientras la región variable de cadena pesada (V_H) y la región variable de cadena ligera (V_L) se originan de un anticuerpo humano. En estos, no hay limitación particular en lo que se refiere a la especie biológica del mamífero no humano, en la medida en que sea un mamífero no humano, si bien se prefieren ratón, rata, conejo, caballo o primate no humano, y se prefiere más el ratón.

[0027] Un anticuerpo quimérico, entre un anticuerpo de ratón y un anticuerpo de mamífero diferente a ratón, es un anticuerpo proporcionado al reemplazar parte de un anticuerpo de ratón con parte de un anticuerpo de mamífero diferente a ratón. Ejemplos específicos de estos anticuerpos quiméricos incluyen un anticuerpo quimérico cuya región Fc se origina de un anticuerpo de ratón, mientras su región Fab se origina de un anticuerpo de mamífero diferente a ratón y, por el contrario, un anticuerpo quimérico cuya región Fc se origina de un mamífero diferente a ratón mientras su región Fab se origina de un anticuerpo de ratón. En estos, no hay limitación particular en lo que se refiere a la especie biológica del mamífero no ratón, en la medida en que sea un mamífero diferente al ratón, si bien se prefieren rata, conejo, caballo o primate no humano, y se prefiere más el humano.

[0028] Un anticuerpo quimérico entre un anticuerpo humano y un anticuerpo de ratón se designa en particular “anticuerpo quimérico de humano/ratón”. Ejemplos de anticuerpos quiméricos de humano/ratón incluyen un anticuerpo quimérico en el cual la región Fc se origina de un anticuerpo humano, mientras la región Fab se origina de un anticuerpo de ratón y, por el contrario, un anticuerpo quimérico cuya región Fc se origina de anticuerpo de ratón, mientras su región Fab se origina de un anticuerpo humano. Una región de la bisagra se origina ya sea de un anticuerpo humano o un anticuerpo de ratón. Ejemplos específicos adicionales de anticuerpos quiméricos de humano/ratón incluyen aquellos cuya región constante de cadena pesada (C_H) y región constante de cadena ligera (C_l) se originan de un anticuerpo humano, mientras su región variable de cadena pesada (V_H) y región variable de cadena ligera (V_L) se originan de un anticuerpo de ratón y, por el contrario, aquellos cuya región constante de cadena pesada (C_H) y región constante de cadena ligera (C_l) se originan de un anticuerpo de ratón, mientras su región variable de cadena pesada (V_H) y región variable de cadena ligera (V_L) se originan de un anticuerpo humano.

[0029] Originalmente, un anticuerpo es de la estructura básica que tiene cuatro cadenas polipeptídicas en total, que consisten en dos cadenas ligeras de inmunoglobulina y dos cadenas pesadas de inmunoglobulina. Sin embargo, en la presente invención el término “anticuerpo” se refiere, además de un anticuerpo que tiene esta estructura básica, también a:

(1) uno que consiste en dos cadenas polipeptídicas: una sola cadena ligera de inmunoglobulina y una sola cadena pesada de

inmunoglobulina, y también, como se explica después,

(2) un anticuerpo de cadena sencilla que consiste en una cadena ligera de inmunoglobulina que se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora que a su vez se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a una cadena pesada de inmunoglobulina,

(3) anticuerpos de cadena sencilla que consisten en una cadena pesada de inmunoglobulina que se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora que a su vez se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a una cadena ligera de inmunoglobulina, y

(4) uno que consiste en una región Fab, es decir, una estructura que se deja detrás por el retiro de la región Fc de un anticuerpo que tiene la estructura básica, como el significado original, y uno que consiste en la región Fab y la totalidad o parte de la región de la bisagra (incluyendo Fab, F(ab') y $F(ab')_2$) también se incluyen en el término "anticuerpo" en la presente invención.

[0030] El término "Fab" se refiere a una molécula que consiste en una sola cadena ligera que comprende la región variable y la región C_L (región constante de cadena ligera) y una sola cadena pesada que comprende la región variable y la región C_H1 (porción 1 de la región constante de cadena pesada) las cuales se combinan por un enlace disulfuro entre sus residuos de cisteína respectivos. Mientras la cadena pesada en Fab puede incluir parte de la región de la bisagra además de la región variable y la región C_H1 (porción 1 de la región constante de cadena pesada), la región de la bisagra en tal caso carece del residuo de cisteína que de otro modo se presenta en la región de la bisagra y podría servir para enlazar dos cadenas pesadas de un anticuerpo en conjunto.

En Fab, la cadena ligera y la cadena pesada se conectan por un enlace disulfuro formado entre el residuo de cisteína presente en la región constante de cadena ligera (región C_L) y el residuo de cisteína ubicado en la región constante de cadena pesada (región C_H1) o la región de la bisagra. Dado que carece del residuo de cisteína en la región de la bisagra que sirve para unir dos cadenas pesadas de un anticuerpo, Fab consiste en una sola cadena ligera y una sola cadena pesada. La cadena ligera que constituye Fab incluye una región variable y una región C_L. La cadena pesada como componente de Fab puede consistir en una región variable y una región C_H1, o también en parte de la región de la bisagra además de la región variable y la región C_H1. Sin embargo, en el último caso, la región de la bisagra se selecciona así para no incluir el residuo de cisteína que podría unir dos cadenas pesadas, con el fin de evitar la formación de un enlace disulfuro entre dos cadenas pesadas en sus regiones de la bisagra. En F(ab'), la cadena pesada incluye, además de una región variable y una región C_H1, la totalidad o parte de una región de la bisagra que contiene un residuo de cisteína que podría unir dos cadenas pesadas. $F(ab')_2$ es una molécula que consiste en dos F(ab')s unidas a través de un enlace disulfuro formado entre los residuos de cisteína presentes en sus regiones de la bisagra respectivas. Más aún, un polímero, tal como un dímero y un trímero, que consiste en dos o más anticuerpos conectados entre sí directamente o mediante un enlazador, también se incluye en el término "anticuerpo". Más aún, además de lo antes mencionado, cualquier molécula que incluye parte de una molécula de inmunoglobulina y tiene una propiedad para unirse específicamente al antígeno también se

incluye en el término “anticuerpo” en la presente invención. De este modo, en la presente invención el término “cadena ligera de inmunoglobulina” incluye una molécula que se deriva de una cadena ligera de inmunoglobulina original y que tiene la secuencia de aminoácidos de la totalidad o parte de su región variable. Asimismo, el término “cadena pesada de inmunoglobulina” incluye una molécula que se deriva de una cadena pesada de inmunoglobulina original y que tiene la secuencia de aminoácidos de la totalidad o parte de su región variable. Por lo tanto, en la medida en que tenga la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de la región variable, una molécula se incluye en el término “cadena pesada de inmunoglobulina”, incluso si carece de su región Fc, por ejemplo.

[0031] En lo anterior, el término “Fc” o “región Fc” se refiere a una región que comprende un fragmento que consiste en la región C_H2 (porción 2 de la región constante de cadena pesada), y la región C_H3 (porción 3 de la región constante de cadena pesada) en la molécula de anticuerpo.

[0032] Aún más, en la presente invención el término “anticuerpo” también incluye:

(5) scFab, scF(ab’) y scF(ab’)$_2$, que son anticuerpos de cadena sencilla producidos por la unión de la cadena ligera a la cadena pesada que forman, respectivamente, Fab, F(ab’) y F(ab’)$_2$ mencionadas en (4) arriba citado, mediante una secuencia enlazadora. Estas scFab, scF(ab’) y scF(ab’)$_2$ pueden ser una molécula en la cual ya sea la cadena ligera se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora, la cual a su vez se enlaza, en el lado C terminal de la misma,

a la cadena pesada, o ya sea la cadena pesada se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora, la cual a su vez se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a la cadena ligera. Aún más, una scFv, la cual es un anticuerpo de cadena sencilla proporcionado al unir la región variable de cadena ligera a la región variable de cadena pesada, mediante una secuencia enlazadora entre ellas, también se incluye en el término "anticuerpo" en la presente invención. Esta scFv puede ser una molécula en la cual ya sea la región variable de cadena ligera se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora, la cual a su vez se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a la región variable de cadena pesada, o ya sea la región variable de cadena pesada se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora, la cual a su vez se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a la región variable de cadena ligera.

[0033] Aún más, además de un anticuerpo de longitud completa y los descritos en (1) a (5) arriba citados, el término "anticuerpo" en la presente especificación incluye cualquier forma de fragmento de unión a antígenos que carece de parte del anticuerpo de longitud completa (fragmento de anticuerpo), un concepto más amplio que incluye (4) y (5) arriba citados.

[0034] El término "fragmento de unión a antígenos" se refiere a un fragmento de anticuerpo que retiene por lo menos parte de la actividad de unión específica para su antígeno. Además de los arriba descritos en (4) y (5), los ejemplos de fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, región variable (Fv); un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) producido al enlazar la región variable de cadena pesada (V_H) y la

región variable de cadena ligera (V_L), mediante un enlazador apropiado entre las mismas; un diacuerpo, el cual es un dímero de un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L); un minicuerpo, el cual es un dímero de una molécula en la cual la cadena pesada (cadena H) de un scFv se enlaza a parte de la región constante (C_H3), y otros anticuerpos de bajo peso molecular. Sin embargo, en la medida en que tenga capacidad de unión a antígenos, el término no se limita a estas moléculas. Estos fragmentos de unión incluyen no sólo los producidos al tratar una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima apropiada, sino también aquellos producidos por células hospedadoras apropiadas al utilizar un gen de anticuerpo diseñado genéticamente.

[0035] En la presente invención, el término “anticuerpo de cadena sencilla” se refiere a una proteína en la cual una secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina enlazada, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora, la cual a su vez se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a la secuencia de aminoácidos de la totalidad o parte de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina, y que tiene la capacidad para unirse específicamente a cierto antígeno. Por ejemplo, los descritos en (2), (3) y (5) se incluyen en “anticuerpo de cadena sencilla”. Más aún, una proteína en la cual una secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora, la cual a su

vez además se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a la secuencia de aminoácidos de la totalidad o parte de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, y la cual tiene la capacidad para unirse específicamente a cierto antígeno, también se incluye en el término "anticuerpo de cadena sencilla" en la presente invención. En un anticuerpo de cadena sencilla en el cual una cadena pesada de inmunoglobulina se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora, a una cadena ligera de inmunoglobulina, la cadena pesada de inmunoglobulina por lo general carece de la región Fc. Una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) las cuales participan en la determinación de la especificidad antigénica de un anticuerpo. Asimismo, una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina también tiene tres CDR. Esas CDR son las regiones primarias que determinan la especificidad antigénica de un anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo de cadena sencilla de preferencia contiene la totalidad de las tres CDR de la cadena pesada de inmunoglobulina y la totalidad de las tres CDR de la cadena ligera de inmunoglobulina. Sin embargo, también es posible proporcionar un anticuerpo de cadena sencilla en el cual una o más de esas CDR se eliminan, en la medida en que la afinidad específica de antígenos del anticuerpo se retenga.

[0036] En un anticuerpo de cadena sencilla, la secuencia enlazadora colocada entre la cadena ligera y la cadena pesada de la inmunoglobulina de preferencia es una cadena peptídica que consiste de preferencia en 2 a 50, de más preferencia 8 a 50, aún de más preferencia

10 a 30, incluso de más preferencia 12 a 18, o 15 a 25, por ejemplo, 15 o 25 residuos de aminoácidos. Aunque no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos específica de esta secuencia enlazadora en la medida en que el anticuerpo anti-hTfR, que comprende ambas cadenas enlazadas en consecuencia, retenga la afinidad por hTfR, de preferencia se produce de glicina solamente, o de glicina y serina: por ejemplo, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5), o una secuencia que incluye 2 a 10 o 2 a 5 repeticiones de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, en el enlazamiento de la secuencia de aminoácidos de toda la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora, a la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, la secuencia enlazadora de preferencia es una secuencia enlazadora que comprende 15 aminoácidos que corresponde a tres de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3) enlazadas consecutivamente.

[0037] En la presente invención, el término “receptor de transferrina humana” o “hTfR” se refiere a una proteína membranal que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 1. El anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, en una de sus modalidades, es el que se une específicamente a la región del residuo de

cisteína en la posición 89, del lado N terminal a la fenilalanina en el extremo C terminal, en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 1 (es decir, la región extracelular del hTfR), si bien no se limita a esta modalidad. Más aún, en la presente invención, el término "receptor de transferrina de mono" o "TfR de mono" se refiere en particular a la proteína membranal que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 2, que se origina de macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*). El anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, en una de sus modalidades, es el que se une también a la región del residuo de cisteína en la posición 89, del lado N terminal a la fenilalanina en el extremo C terminal, en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 2 (es decir, la región extracelular del TfR de mono), si bien no se limita a esta modalidad.

[0038] Para la preparación de un anticuerpo para hTfR, se conoce un método general, de acuerdo con el cual un receptor de transferrina humana recombinante (rhTfR) se produce al utilizar células que tienen un vector de expresión introducido que tiene un gen de hTfR incorporado, y luego se inmunizan animales, tales como ratones, con este rhTfR. Al recolectar esas células que producen anticuerpos para hTfR a partir de los animales inmunizados y fusionarlas con células de mieloma, pueden obtenerse células de hibridoma que tienen la capacidad para producir el anticuerpo.

[0039] Más aún, células que producen un anticuerpo para hTfR también pueden obtenerse al recolectar células inmunocompetentes a partir de un animal, tal como un ratón, e inmunizarlas con rhTfR por inmunización *in vitro*. Al conducir inmunización *in vitro*, no hay limitación

particular en lo que se refiere a la especie animal a partir de la cual se derivan las células inmunocompetentes, si bien se prefieren ratón, rata, conejo, cobayo, perro, gato, caballo y primates incluyendo el humano y, se prefieren más ratón, rata y humano, y aún de más preferencia ratón y humano. Como células inmunocompetentes de ratón, pueden utilizarse esplenocitos preparados a partir de bazo de ratón, por ejemplo. Como células inmunocompetentes humanas, pueden utilizarse células tales como las preparadas a partir de sangre periférica humana, médula ósea, bazo y similares. Al inmunizar células inmunocompetentes humanas de acuerdo con la inmunización *in vitro*, puede obtenerse un anticuerpo humano para hTfR.

[0040] Después de inmunizar las células inmunocompetentes de acuerdo con la inmunización *in vitro*, las células pueden fusionarse con células de mieloma para preparar células de hibridoma que tienen la capacidad para producir el anticuerpo. Más aún, también es posible extraer mRNA a partir de las células inmunizadas, sintetizar cDNA, realizar una reacción de PCR al utilizar el cDNA como plantilla para amplificar un fragmento de DNA que contiene el gen que codifica la cadena ligera y la cadena pesada de la inmunoglobulina, y reconstruir artificialmente el gen de anticuerpo al utilizarlos.

[0041] Las células de hibridoma recientemente obtenidas arriba también incluyen estas células que producen anticuerpos que reconocen proteínas diferentes a hTfR. Aún más, no todas las células de hibridoma que producen un anticuerpo anti-hTfR necesariamente producen un anticuerpo anti-hTfR que exhibe altas afinidades para hTfR.

[0042] Asimismo, los genes de anticuerpos artificialmente reconstruidos incluyen genes que codifican anticuerpos que reconocen proteínas diferentes a hTfR como antígenos. Más aún, no todos los genes que codifican anticuerpos anti-hTfR necesariamente tienen propiedades deseadas, tales como codificar un anticuerpo anti-hTfR que exhibe alta afinidad por hTfR.

[0043] Por lo tanto, se necesita una etapa de selección para seleccionar células de hibridoma que producen un anticuerpo que tiene propiedades deseadas (tales como alta afinidad por hTfR) a partir de las células de hibridoma recientemente obtenidas arriba. Más aún, en el caso donde se reconstruyen artificialmente genes de anticuerpos, una etapa de selección es necesaria para seleccionar, a partir de los genes de anticuerpos, un gen que codifica un anticuerpo que tiene propiedades deseadas (tales como altas afinidades para hTfR). Para seleccionar células de hibridoma que producen anticuerpos que exhibe altas afinidades para hTfR (anticuerpos de alta afinidad), o para seleccionar genes que codifican anticuerpos de alta afinidad, los siguientes métodos, explicados con detalle a continuación, son efectivos. Por otro lado, los anticuerpos que exhiben alta afinidad por hTfR son aquellos cuya constante de disociación (K_D) con hTfR, al medirse por el método descrito en el Ejemplo 7, de preferencia no es mayor a 1×10^{-8} M, de más preferencia no mayor a 1×10^{-9} M, aún de más preferencia no mayor a 1×10^{-10} M, e incluso de más preferencia no mayor a 1×10^{-11} M. Por ejemplo, aquellos que tienen una constante de disociación de 1×10^{-13} M a 1×10^{-9} M, o 1×10^{-13} M a 1×10^{-10} M son preferibles.

[0044] Por ejemplo, para seleccionar células de hibridoma que

producen anticuerpos de alta afinidad por el anticuerpo anti-hTfR, se emplea un método en el cual hTfR recombinante se adiciona a una placa y se mantiene en la misma, luego el sobrenadante de cultivo de la células de hibridoma se adiciona, y después de retirar el anticuerpo si unir al hTfR recombinante de la placa, se mide la cantidad del anticuerpo mantenido en la placa. De acuerdo con este método, mientras mayor es la afinidad por hTfR del anticuerpo contenido en el sobrenadante de cultivo de las células de hibridoma adicionadas a la placa, mayor es la cantidad de anticuerpo mantenido en la placa. Por lo tanto, al medir la cantidad del anticuerpo mantenido en la placa, es posible seleccionar aquellas células de hibridoma que corresponden a las placas donde el anticuerpo se mantiene en la mayor cantidad, dado que las líneas celulares producen un anticuerpo anti-hTfR que tiene la afinidad relativamente superior para hTfR. También es posible aislar el gen que codifica el anticuerpo de alta afinidad al extraer mRNA a partir de cada línea celular seleccionada de esta manera, sintetizar cDNA, y amplificar un fragmento de DNA que contiene el gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR por PCR al utilizar el cDNA como plantilla.

[0045] Con el fin de seleccionar el gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad a partir de los genes de anticuerpos artificialmente reconstruidos anteriores, los genes de anticuerpos artificialmente reconstruidos se incorporan una vez en un vector de expresión, y el vector de expresión luego se introduce en células hospedadoras. Aunque no hay limitación particular en lo que se refiere a las células a emplearse como células hospedadoras, incluso si son

procarióticas o eucarióticas, en la medida en que puedan expresar el gen de anticuerpo después de la introducción de un vector de expresión que tiene el gen de anticuerpo artificialmente reconstruido incorporado, se prefieren células que se originan de mamíferos tales como humano, ratón, hámster chino, y similares, y particularmente se prefieren células CHO que se originan de células de ovario de hámster chino, o células NS/0 que se origina de mieloma de ratón. Más aún, no hay limitación particular en lo que se refiere a un vector de expresión a emplearse para la incorporación del gene codificante de anticuerpo y su expresión, y cualquier vector de expresión puede utilizarse en la medida en que pueda expresar el gen cuando se introduce en células de mamífero. El gen incorporado en un vector de expresión se ubica corriente abajo de una secuencia de DNA que puede regular la frecuencia de transcripción de un gen en células de mamífero (sitio regulador de expresión génica). Los ejemplos de sitios reguladores de expresión génica que pueden emplearse en la presente invención incluyen promotor derivado de citomegalovirus, promotor temprano de SV40, promotor de factor de elongación humano 1α (EF-1α), promotor de ubiquitina humana C.

[0046] Las células de mamífero que tienen este vector de expresión introducido llegan a expresar el anticuerpo artificialmente reconstruido incorporado en el vector de expresión. Con el fin de seleccionar aquellas células que producen un anticuerpo de alta afinidad por el anticuerpo anti-hTfR a partir de las células obtenidas anteriores, que expresan el anticuerpo artificialmente reconstruido, se emplea un método en el cual el hTfR recombinante se adiciona a una placa y se contiene por la misma, luego el hTfR recombinante se contacta por el

sobrenadante de cultivo de las células y, después del retiro de anticuerpo sin unir al hTfR recombinante de la placa, se mide la cantidad del anticuerpo mantenido en la placa. De acuerdo con este método, mientras mayor es la afinidad por hTfR del anticuerpo contenido en el sobrenadante de cultivo de las células, mayor es la cantidad de anticuerpo mantenido en la placa. Por lo tanto, al medir la cantidad del anticuerpo contenido en la placa, pueden seleccionarse aquellas células que corresponden a la placa donde el anticuerpo se contiene en la mayor cantidad, dado que una línea celular produce un anticuerpo anti-hTfR que tiene relativamente el anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad, y eventualmente puede seleccionarse un gen que codifica un anticuerpo anti-hTfR que tiene un anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad para hTfR. Al utilizar una línea celular seleccionada de esta manera, puede realizarse PCR para amplificar un fragmento de DNA que contiene el gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR para aislar el gen que codifica el anticuerpo de alta afinidad.

[0047] La selección del gen que codifica un anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad a partir de los genes de anticuerpos artificialmente reconstruidos anteriores también puede llevarse a cabo al incorporar los genes de anticuerpos artificialmente reconstruidos en un vector de expresión, introducir el vector de expresión en células de *E. coli*, cultivar las células de *E. coli*, y seleccionar las células de *E. coli* que tienen el gen deseado, de la misma manera que en la selección anterior de células de hibridoma, utilizar el sobrenadante de cultivo de las células de *E. coli* o una solución que contiene anticuerpos preparada al lisar las células de *E. coli*. Las células de *E. coli* seleccionadas de este

modo expresan el gen que codifica un anticuerpo anti-hTfR que tiene una afinidad relativamente alta por hTfR. A partir de esta línea celular, puede seleccionarse el gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR que tiene un anticuerpo anti-hTfR de afinidad relativamente alta para hTfR. Con el fin de permitir al anticuerpo secretarse en el sobrenadante de cultivo de *E. coli*, el gen de anticuerpo puede incorporarse en el vector de expresión a fin de que una secuencia de señal de secreción se incorpore en el lado N terminal del gen.

[0048] Otro método para la selección del gen que codifica un anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad es un método en el cual el anticuerpo codificado por el gen de anticuerpo artificialmente reconstruido anterior se expresa y retiene en partículas de fagos. Para esto, el gen de anticuerpo se reconstruye como gen que codifica un anticuerpo de cadena sencilla. Un método para retener el anticuerpo en la superficie de partículas de fagos se da a conocer en las publicaciones internacionales WO1997/09436 y WO1995/11317, y similares y, de este modo, es reconocido. Con el fin de seleccionar fagos que retienen el anticuerpo de alta afinidad para el anticuerpo anti-hTfR a partir de los fagos que retienen los anticuerpos codificados por los genes de anticuerpos artificialmente reconstruidos, se emplea un método en el cual un hTfR recombinante se adiciona a una placa y se mantiene por la misma, se contacta por los fagos y, después del retiro de los fagos no unidos al hTfR recombinante de la placa, se mide la cantidad de los fagos mantenidos por la placa. De acuerdo con este método, mientras mayor es la afinidad por hTfR del anticuerpo retenido en las partículas de fagos, mayor es la cantidad del fago mantenido en la

placa. Por lo tanto, al medir la cantidad del fago contenido en la placa, pueden seleccionarse las partículas de fagos que corresponden a la placa donde los fagos se mantuvieron en la mayor cantidad, dado que las partículas de fagos producen un anticuerpo anti-hTfR que tiene un anticuerpo anti-hTfR de afinidad relativamente alta para hTfR, y eventualmente puede seleccionarse el gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad para hTfR. Al utilizar las partículas de fagos seleccionadas de este modo, puede realizarse PCR para amplificar un fragmento de DNA que contiene el gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR y aislar el gen que codifica el anticuerpo de alta afinidad.

[0049] Es posible preparar cDNA o DNA de fagos a partir de las células anteriores, tales como las células de hibridoma que producen el anticuerpo de alta afinidad para anti-hTfR, o a partir de las partículas de fagos anteriores que retienen el anticuerpo de alta afinidad para anti-hTfR, y realizar PCR o similar al utilizarlo como plantilla para amplificar y aislar un fragmento de DNA que contiene el gen que codifica la totalidad o parte de la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR, la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR, o un anticuerpo de cadena sencilla. De la misma manera, también es posible realizar PCR o similar para amplificar y aislar un fragmento de DNA que contiene el gen que codifica la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR, o un fragmento de DNA que contiene el gen que codifica la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR.

[0050] Un anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad puede obtenerse al incorporar la totalidad o parte del gen que codifica la cadena ligera y la

cadena pesada de este anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad en un vector de expresión, transformar células hospedadoras tales como células de mamífero con este vector de expresión, y cultivar las células transformantes obtenidas. Al utilizar la secuencia de nucleótidos del gen aislado que codifica el anticuerpo anti-hTfR, también es posible traducir la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-hTfR, y sintetizar artificialmente un fragmento de DNA que codifica la misma secuencia de aminoácidos. Al sintetizar artificialmente un fragmento de DNA, el nivel de expresión del anticuerpo anti-hTfR en las células hospedadoras puede potenciarse por la selección apropiada de los codones.

[0051] Con el fin de introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición y similares en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-hTfR original, una mutación puede introducirse según se desee en el gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR contenido en el fragmento de DNA aislado. Si bien el gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR mutado tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, con el gen original, no hay limitación particular en lo que se refiere al nivel de homología. Al introducir una mutación en la secuencia de aminoácidos con el fin de modificar el número o el tipo de cadenas de azúcar unidas al anticuerpo anti-hTfR, también es posible potenciar la estabilidad del anticuerpo anti-hTfR en el cuerpo.

[0052] Cuando se introduce una mutación en el gen que codifica la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR, el gen mutado de este modo tiene una homología que de

preferencia no es menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, con el gen original, si bien no hay limitación particular en lo que se refiere al nivel de homología. Cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. Una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos también puede llevarse a cabo. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a la región variable de cadena ligera, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, y el número de aminoácidos adicionados de preferencia es 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. Una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también puede llevarse a cabo. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, mutada de este modo, tiene una homología que de preferencia no es menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera original. En particular, cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la CDR con otros

aminoácidos, el número de aminoácidos reemplazados de preferencia es 1 a 5, más preferible 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la CDR, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2. Una mutación combinada de esta sustitución y eliminación del aminoácido también puede llevarse a cabo. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos, y el número de aminoácidos adicionados de preferencia es 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2. Una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también puede llevarse a cabo. La secuencia de aminoácidos de la CDR mutada respectiva tiene una homología que de preferencia no es menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, y aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la CDR original.

[0053] Cuando se introduce una mutación en el gen que codifica la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR, el gen mutado de este modo tiene una homología que de preferencia no es menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, con el gen original, si bien no hay limitación particular en lo que se refiere al nivel de homología. Cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se

elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. Una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos también puede llevarse a cabo. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a la región variable de cadena pesada, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, y el número de aminoácidos adicionados de preferencia es 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. Una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también puede llevarse a cabo. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, mutada de este modo, tiene una homología que de preferencia no es menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada original. En particular, cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la CDR con otros aminoácidos, el número de aminoácidos reemplazados de preferencia es 1 a 5, más preferible 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la CDR, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2. Una mutación combinada de esta sustitución y eliminación del aminoácido también puede llevarse a cabo. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos,

pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos, y el número de aminoácidos adicionados de preferencia es 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2. Una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también puede llevarse a cabo. La secuencia de aminoácidos de la CDR mutada respectiva tiene una homología que de preferencia no es menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, y aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la CDR original.

[0054] Una mutación puede introducirse en las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR, al combinar la mutación anterior en la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR y la mutación anterior en la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR.

[0055] Los ejemplos de la sustitución arriba mencionada de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR incluyen la sustitución entre aminoácidos ácidos, es decir, ácido aspártico y ácido glutámico, la sustitución entre aminoácidos tipo amida, es decir, asparagina y glutamina, la sustitución entre aminoácidos alcalinos, es decir, lisina y arginina, la sustitución entre aminoácidos ramificados, es decir, valina, leucina e isoleucina, la sustitución entre aminoácidos alifáticos, es decir, glicina y alanina, la sustitución entre hidroxiaminoácidos, es decir, serina y treonina, y la sustitución entre aminoácidos aromáticos, es decir, fenilalanina y tirosina.

[0056] Por otra parte, en el caso donde se introduce una mutación en el

anticuerpo anti-hTfR al adicionar uno o más aminoácidos al extremo C terminal o extremo N terminal, si el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) se fusionan mediante los aminoácidos adicionados, los aminoácidos adicionados constituyen parte de un enlazador. Una explicación detallada se ofrecerá después sobre un enlazador que se coloca entre el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A), en el caso donde el anticuerpo anti-hTfR se fusiona con la proteína diferente (A).

[0057] El anticuerpo anti-hTfR, obtenido al cultivar las células seleccionadas por los métodos anteriores y similares, para producir un anticuerpo anti-hTfR que tiene una afinidad relativamente alta para hTfR, y el anticuerpo anti-hTfR obtenido por la expresión del gen que codifica un anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad, puede modificarse al introducir una mutación en sus secuencias de aminoácidos, tal como una sustitución, eliminación, adición, para ofrecerles propiedades deseadas. La introducción de una mutación en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-hTfR puede realizarse al introducir una mutación en el gen que corresponde a la secuencia de aminoácidos.

[0058] La afinidad de un anticuerpo anti-hTfR por hTfR puede ajustarse según se desee por la introducción de una mutación, tal como una sustitución, eliminación y adición, en la secuencia de aminoácidos de una región variable del anticuerpo. Por ejemplo, si un anticuerpo tiene alta afinidad por su antígeno tal que conduce a una muy baja constante de disociación en una solución acuosa, hay una posibilidad de que el anticuerpo, después de administrarse al cuerpo, pueda fallar en disociarse del antígeno, lo que en consecuencia conduce a una

desventaja funcional. En tal caso, un anticuerpo más preferible, adecuado para un propósito determinado, puede obtenerse al introducir una mutación en la región variable del anticuerpo con el fin de ajustar su constante de disociación en etapas a 2 a 5 veces, 5 a 10 veces, 10 a 100 veces, etcétera, la del anticuerpo original. Por el contrario, la constante de disociación puede ajustarse en etapas a 1/2 a 1/5 veces, 1/5 a 1/10 veces, 1/10 a 1/100 veces, etcétera, la del anticuerpo original, al introducir una mutación.

[0059] La introducción de una mutación, tal como una sustitución, eliminación y adición, a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-hTfR, puede realizarse ya sea, por ejemplo, al introducir una mutación en ciertas posiciones de la secuencia de nucleótidos del gen, o por la introducción aleatoria de una mutación por PCR o los similares, al utilizar el gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR como plantilla.

[0060] La introducción de una mutación en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-hTfR, para ajustar la afinidad del anticuerpo por hTfR, puede llevarse a cabo, por ejemplo, al incorporar un gen que codifica el anticuerpo anti-hTfR como anticuerpo de cadena sencilla en un fagémido, preparar con este fagémido un fago con anticuerpo de cadena sencilla expresado en la superficie de su cápside, dejar al fago multiplicarse mientras se introduce una mutación en el gen que codifica el anticuerpo de cadena sencilla por la aplicación de un mutágeno o los similares, y seleccionar, a partir del fago multiplicado, un fago que expresa un anticuerpo de cadena sencilla que tiene una constante de disociación deseada ya sea por el método arriba descrito o por purificación al utilizar una columna de antígeno bajo cierta

condición.

[0061] Los anticuerpos que tienen una de afinidad relativamente alta por hTfR, obtenidos por el método arriba mencionado de selección de las células que producen un anticuerpo de alta afinidad, son aquellos cuya constante de disociación (K_D) con hTfR, al medirse por el método descrito en el Ejemplo 7, de preferencia no es mayor a 1×10^{-8} M, de más preferencia no mayor a 1×10^{-9} M, aún de más preferencia no mayor a 1×10^{-10} M, e incluso de más preferencia no mayor a 1×10^{-11} M. Por ejemplo, aquellos que tienen una constante de disociación de 1×10^{-13} M a 1×10^{-9} M, o 1×10^{-13} M a 1×10^{-10} M son preferibles. Lo mismo también se aplica si los anticuerpos son anticuerpos de cadena sencilla. Una vez que se obtiene un anticuerpo, puede modificarse según se desee, por ejemplo, al introducir una mutación para ofrecerle una propiedad deseada.

[0062] Un anticuerpo que tiene afinidad por TfR tanto humano como de mono puede obtenerse por la selección de anticuerpos que tienen afinidad por TfR de mono a partir de los anticuerpos que tienen una de afinidad relativamente alta, que se han obtenido por el método arriba descrito que involucra la selección de las células que producen un anticuerpo de alta afinidad. La selección de anticuerpos que tienen afinidad por TfR de mono puede llevarse a cabo, por ejemplo, por ELISA al utilizar un TfR de mono recombinante que se prepara al utilizar tecnologías de DNA recombinante. En este ELISA, un TfR de mono recombinante se adiciona a una placa y se contiene en la misma, y se contacta por el anticuerpo anti-hTfR y, después del retiro del anticuerpo no unido al TfR de mono recombinante de la placa, se mide

la cantidad del anticuerpo mantenido por la placa. Mientras mayor es su afinidad por el hTfR de mono recombinante, se vuelve mayor la cantidad del anticuerpo mantenido por la placa. Por consecuencia, el anticuerpo que corresponde a la placa que mantiene la mayor cantidad de anticuerpo puede seleccionarse como el anticuerpo que tiene afinidad por TfR de mono. Aquí, el término "mono" de preferencia se clasifica como simios excepto el humano, de más preferencia como *Cercopithecidae*, aún de más preferencia como macacos y, por ejemplo, macaco cangrejero o mono Rhesus, entre los cuales el macaco cangrejero es conveniente para su uso en el examen.

[0063] Un anticuerpo que tiene afinidad por hTfR humano y de mono ofrece una ventaja en que permite la observación farmacocinética del anticuerpo administrado al cuerpo al utilizar un mono. Por ejemplo, si un medicamento se desarrolla al utilizar este anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, el progreso de su desarrollo puede acelerarse en forma notable, y su estudio farmacocinético puede realizarse al utilizar un mono.

[0064] Un anticuerpo que tiene una de afinidad relativamente alta por hTfR y que tiene afinidad por TfR humano y de mono, simultáneamente, exhibe una constante de disociación con TfR de mono, al medirse por el método descrito en el Ejemplo 7, que de preferencia no es mayor a 5×10^{-8} M, de más preferencia no mayor a 2×10^{-8} M, y aún de más preferencia no mayor a 1×10^{-8} M. Por ejemplo, se prefiere uno que exhibe una constante de disociación de 1×10^{-13} M a 2×10^{-8} M, o 1×10^{-13} M a 2×10^{-8} M. Lo mismo también se aplica si el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.

[0065] Si un anticuerpo que tiene una de afinidad relativamente alta por hTfR y se obtiene por el método anterior en el cual se seleccionaron aquellas células que producen un anticuerpo de alta afinidad, es un anticuerpo de un animal no humano, puede convertirse a un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo producido al reemplazar una región apropiada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos de parte de la región variable (por ejemplo, la totalidad o parte de las CDR) de un anticuerpo de animal no humano (implante de la secuencia en la región apropiada de un anticuerpo humano) mientras se mantiene la especificidad para el antígeno. Los ejemplos de anticuerpos humanizados incluyen un anticuerpo producido al reemplazar las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en la cadena ligera de inmunoglobulina, y las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en la cadena pesada de inmunoglobulina, ambas constituyendo un anticuerpo humano, con las CDR de un mamífero no humano. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la especie biológica a partir de la cual se derivan las CDR a incorporarse en el anticuerpo humano, siempre y cuando sea un mamífero no humano, de preferencia es un ratón, rata, conejo, caballo y primate no humano, de más preferencia un ratón y rata, y aún de más preferencia un ratón.

[0066] Los métodos para la preparación de un anticuerpo humanizado se reconocen en la técnica, y el más común es un método en el cual la secuencia de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), en la región variable de un anticuerpo humano, se reemplaza con las CDR de un anticuerpo de mamífero no

humano, como se concibe por Winter et al. (Verhoeyen M. Science. 239, 1534-1536 (1988)). También se reconoce que, en algunos casos, la parte correspondiente de un anticuerpo humano aceptor necesita reemplazarse no sólo con las CDR del anticuerpo de mamífero no humano, sino también con las secuencias de aminoácidos que se presentan en regiones fuera de las CDR que tiene una función en el mantenimiento de la estructura de las CDR o en la unión al antígeno, con el fin de reproducir la actividad que el anticuerpo donador posee originalmente (Queen C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86. 10029-10033 (1989)). Aquí, las regiones fuera de las CDR se denominan regiones marco (FR).

[0067] De este modo, la preparación de un anticuerpo humanizado involucra procesos de implantación de las CDR (y sus FR vecinas, según sea el caso) del anticuerpo de mamífero no humano en lugar de las CDR (y sus FR vecinas, según sea el caso) en la región variable de un anticuerpo humano. En estos procesos, la región de marco de inicio de la región variable de un anticuerpo humano puede obtenerse a partir de una base de datos de DNA pública y similares, que incluye genes de anticuerpos de líneas germinales. Por ejemplo, secuencias de DNA de líneas germinales, así como secuencias de aminoácidos, de regiones variables de cadena pesada y cadena ligera humanas, pueden seleccionarse a partir de la base de datos de líneas germinales humanas "VBase" (disponible en la Internet, en www.mrc- cpe.cam.ac.uk/vbase). Por otra parte, pueden seleccionarse a partir de secuencias de DNA y secuencias de aminoácidos descritas en la literatura publicada, tal como "Kabat EA. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.,

U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242 (1991)"; "Tomlinson IM. J. fol. Biol. 227. 776-98 (1992)"; y "Cox JPL. Eur. J Immunol. 24:827-836 (1994)".

[0068] Como se menciona antes, en un anticuerpo humanizado, las regiones de un anticuerpo de mamífero no humano a implantarse en las regiones variables del anticuerpo humano original por lo general incluyen las CDR en sí misma, o las CDR y su parte vecina de las FR. Sin embargo, estas FR implantadas en conjunto con las CDR también tienen una función, ya sea en el mantenimiento de la estructura de las CDR o en la unión al antígeno, lo que de esta manera tiene una función sustancial en la determinación de la complementariedad de un anticuerpo, y el término "CDR" en la presente invención, por lo tanto, se refiere a estas regiones que se toman o podrían tomarse de un anticuerpo de mamífero no humano e injertarse en un anticuerpo humanizado, en la preparación de un anticuerpo humanizado. De este modo, una región generalmente considerada en una región FR se incluye en una CDR en la presente invención, en la medida en que participe ya sea en el mantenimiento de la estructura de la CDR o en la unión al antígeno y, de este modo, se considera que tiene una función sustancial en la determinación de la complementariedad del antígeno.

[0069] El anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, cuando se administra al cuerpo, por ejemplo, por inyección intravenosa, se une con eficiencia a hTfR que existe en las células endoteliales de los capilares en el cerebro. El anticuerpo unido al hTfR se lleva hacia el cerebro a través de la barrera hematoencefálica por mecanismos tales como endocitosis y transcitosis. Por lo tanto, al unirse al anticuerpo

anti-hTfR de la presente invención, las proteínas, compuestos de bajo peso molecular y los similares, que necesitan funcionar en el cerebro, pueden suministrarse con eficiencia en el cerebro a través de la barrera hematoencefálica. Más aún, el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, después de pasar a través de la barrera hematoencefálica, puede alcanzar el parénquima cerebral y las células de tipo neuronal en el hipocampo, células de Purkinje y similares del cerebelo, o por lo menos uno de ellos. Y también se espera que alcance a las células de tipo neuronal en el cuerpo estriado del cerebro, y las células de tipo neuronal en la sustancia negra del mesencéfalo. Por lo tanto, es posible hacer que una de esas proteínas, compuestos de bajo peso molecular y similares, que pueden actuar sobre estos tejidos o células, alcancen los tejidos o células, al unirlos al anticuerpo anti-hTfR de la presente invención.

[0070] El anticuerpo anti-hTfR de la presente invención puede ser un medio efectivo para hacer que esos compuestos (proteínas, compuestos de bajo peso molecular y similares) se transfieran de la sangre al cerebro y funcionen ahí, compuestos que de otro modo no pueden pasar a través de la barrera hematoencefálica cuando se administran por vía intravenosa y, por lo tanto, no pueden o pueden exhibir difícilmente sus funciones fisiológicas o farmacológicas en el cerebro. En particular, el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, después de pasar a través de la barrera hematoencefálica, puede alcanzar el parénquima cerebral y las células de tipo neuronal en el hipocampo, células de Purkinje y similares del cerebelo, o por lo menos uno de ellos. Y también se espera que alcance a las células de tipo neuronal en el cuerpo estriado

del cerebro, así como a las células de tipo neuronal en la sustancia negra del mesencéfalo. Por lo tanto, es posible hacer que esos compuestos funcionen o aumenten su función, en aquellos tejidos o células en el cerebro, al administrar esos compuestos en forma combinada con la molécula de anticuerpo anti-hTfR, por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa.

[0071] Para unir un anticuerpo anti-hTfR a estos compuestos (proteínas, compuestos de bajo peso molecular y similares), se encuentra disponible un método para unirlos en conjunto mediante un enlazador no peptídico o un enlazador peptídico. Como enlazadores no peptídicos, pueden utilizarse polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímero de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil éter, polímero biodegradable, lípido polimerizado, quitinas y ácido hialurónico, o derivados de los mismos o combinaciones de los mismos. Un enlazador peptídico es una cadena peptídica que consiste en 1 a 50 aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos o un derivado de los mismos, cuyo extremo N terminal y extremo C terminal deben enlazarse de manera covalente ya sea a un anticuerpo anti-hTfR o un compuesto tal como una proteína, un compuesto de bajo peso molecular y similares, respectivamente, para unir el anticuerpo anti-hTfR a este compuesto como una proteína o un compuesto de bajo peso molecular.

[0072] En particular, un conjugado que se forma al unir el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención a una proteína diferente deseada (A) mediante PEG como enlazador no peptídico, se designa “anticuerpo anti-hTfR-PEG-proteína”. Un anticuerpo anti-hTfR-PEG-proteína

puede prepararse al unir primero el anticuerpo anti-hTfR a PEG para formar un anticuerpo anti-hTfR-PEG, y luego unir el anticuerpo anti-hTfR-PEG a la proteína diferente (A). Como alternativa, un anticuerpo anti-hTfR-PEG-proteína puede prepararse al unir primero la proteína diferente (A) a PEG para formar "proteína-PEG", y luego unir la "proteína-PEG" al anticuerpo anti-hTfR. Con el fin de unir PEG al anticuerpo anti-hTfR y la proteína diferente (A), se emplea un PEG que se modifica con grupos funcionales tales como carbonato, carbonilimidazol, éster activo de ácido carboxílico, azlactona, tiona de imida cíclica, isocianato, isotiocianato, imidato, aldehído o los similares. Estos grupos funcionales introducidos a PEG reaccionan principalmente con grupos amino en el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) para unir de manera covalente PEG al anticuerpo para hTfR y una proteína diferente (A). Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere al peso molecular y la configuración del PEG empleado aquí, su peso molecular (MW) medio es de la siguiente manera: de preferencia MW = 500 a 60000, de más preferencia MW = 500 a 20000. Por ejemplo, PEG cuyo peso molecular medio es de aproximadamente 300, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, aproximadamente 2000, aproximadamente 4000, aproximadamente 10000, aproximadamente 20000 y similares. De preferencia se utiliza PEG como enlazador no peptídico. El anti-anticuerpo para hTfR puede unirse a un compuesto de bajo peso molecular deseado de la misma manera que arriba.

[0073] Por ejemplo, el "anticuerpo anti-hTfR-PEG" puede prepararse al mezclar el anticuerpo anti-hTfR con un polietilenglicol que tiene grupos

aldehído como grupos funcionales (ALD-PEG-ALD) a fin de que la relación molar de ALD-PEG-ALD al anticuerpo sea 11, 12.5, 15, 110, 120 y similares, y luego adicionar a la mezcla un agente reductor tal como $NaCNBH_3$ para dejar que tenga lugar una reacción. Luego, al hacer reaccionar el "anticuerpo anti-hTfR-PEG" con una proteína diferente (A) en presencia de un agente reductor tal como $NaCNBH_3$, se obtiene "anticuerpo anti-hTfR-PEG-proteína". Por el contrario, también es posible obtener el "anticuerpo anti-hTfR-PEG-proteína" al unir primero una proteína diferente (A) a ALD-PEG-ALD para preparar "proteína-PEG", y luego unir la "proteína-PEG" al anticuerpo anti-hTfR.

[0074] El anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) también pueden unirse en conjunto a través de enlaces peptídicos al enlazar la cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR, en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma, ya sea mediante una secuencia enlazadora o directamente, al extremo N terminal o extremo C terminal de la proteína diferente (A), respectivamente. De este modo, la proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) puede obtenerse al incorporar, en un vector de expresión en mamíferos, un fragmento de DNA en el cual un cDNA que codifica la proteína diferente (A) se coloca en marco de lectura directamente, o mediante un fragmento de DNA que codifica una secuencia enlazadora, en el lado del extremo 3' o extremo 5' de un cDNA que codifica la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR, y cultivar las células de mamífero en las cuales el vector de expresión anterior se ha introducido. En casos donde el fragmento de DNA que codifica una

proteína diferente (A) se enlaza a la cadena pesada, un vector de expresión en mamíferos en el cual un fragmento de cDNA, que codifica la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR, también se introduce en las mismas células hospedadoras, en tanto que si un fragmento de DNA que codifica una proteína diferente (A) se enlaza a la cadena ligera, un vector de expresión en mamíferos, en el cual un fragmento de cDNA que codifica la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR, también se incorpora en las mismas células hospedadoras. En el caso donde el anticuerpo anti-hTfR es un anticuerpo de cadena sencilla, la proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) combinados puede obtenerse al incorporar, en un vector de expresión (para células eucarióticas tales como de mamífero y levadura, o para células procarióticas tales como *E. coli*), un fragmento de DNA que se forma al enlazar el cDNA que codifica una proteína diferente (A), en el lado del extremo 5' o en el lado del extremo 3' del mismo, directamente o mediante un fragmento de DNA que codifica una secuencia enlazadora, al cDNA que codifica el anticuerpo anti-hTfR de cadena sencilla, y dejar que la proteína de fusión se exprese en las células en las cuales el vector de expresión se ha introducido.

[0075] En una proteína de fusión del tipo en el cual una proteína diferente (A) se enlaza a la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR en el lado C terminal de la misma, el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana comprende una secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera y una secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada, y la proteína diferente (A) se enlaza a la cadena ligera de

este anticuerpo anti-receptor de transferrina humana en el lado C terminal de la misma. Aquí, la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) pueden enlazarse en conjunto, directamente o mediante un enlazador.

[0076] En una proteína de fusión del tipo en el cual una proteína diferente (A) se enlaza a la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR en el lado C terminal de la misma, el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana comprende una secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera y una secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada, y la proteína diferente (A) se enlaza a la cadena pesada de este anticuerpo anti-receptor de transferrina humana en el lado C terminal de la misma. Aquí, la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) pueden enlazarse en conjunto, directamente o mediante un enlazador.

[0077] En una proteína de fusión del tipo en el cual una proteína diferente (A) se enlaza a la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR en el lado N terminal de la misma, el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana comprende una secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera y una secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada, y la proteína diferente (A) se enlaza a la cadena ligera de este anticuerpo anti-receptor de transferrina humana en el lado N terminal de la misma. Aquí, la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) pueden enlazarse en conjunto, directamente o mediante un enlazador.

[0078] En una proteína de fusión del tipo en el cual una proteína diferente (A) se enlaza a la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR en el lado N terminal de la misma, el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana comprende una secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera y una secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada, y la proteína diferente (A) se enlaza a la cadena pesada de este anticuerpo anti-receptor de transferrina humana en el lado N terminal de la misma. Aquí, la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) pueden enlazarse en conjunto, directamente o mediante un enlazador.

[0079] En lo anterior, la secuencia enlazadora colocada entre el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) puede ser una cadena peptídica que consiste de preferencia en 1 a 50, de más preferencia en 1 a 17, aún de más preferencia en 1 a 10, incluso de más preferencia en 1 a 5 aminoácidos y, en concordancia con la proteína diferente (A) a enlazarse al anticuerpo anti-hTfR, el número de aminoácidos de la secuencia enlazadora puede ajustarse a 1, 2, 3, 1 a 17, 1 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29, 27, etc., según se desee. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos de la secuencia enlazadora en la medida en que el anticuerpo anti-hTfR enlazado por la misma retenga la afinidad a hTfR y una proteína diferente (A) enlazada por la secuencia enlazadora también exhiba la actividad fisiológica propia de la proteína bajo una condición fisiológica, el enlazador de preferencia puede componerse de glicina y serina. Los ejemplos de estos enlazadores incluyen uno que consiste

en un solo aminoácido, ya sea glicina o serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) o una secuencia que incluye 1 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Tienen secuencias que consisten en 1 a 50, 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29 o 27 aminoácidos. Por ejemplo, los que comprenden la secuencia de aminoácidos Gly-Ser de preferencia pueden utilizarse como secuencias enlazadoras. Más aún, de preferencia se utiliza una secuencia enlazadora que comprende 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0080] En una proteína de fusión del anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A), donde el anticuerpo anti-hTfR es un anticuerpo de cadena sencilla, la secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina y la secuencia de aminoácidos que incluye la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina se enlazan, por lo general mediante una secuencia enlazadora. En la medida en que la afinidad del anticuerpo anti-hTfR por hTfR se retenga, la secuencia de aminoácidos derivada de la cadena ligera puede enlazarse, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora que a su vez se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a la secuencia de

aminoácidos derivada de la cadena pesada o, por el contrario, la secuencia de aminoácidos derivada de la cadena pesada puede enlazarse, en el lado C terminal de la misma, a una secuencia enlazadora que a su vez se enlaza, en el lado C terminal de la misma, a la secuencia de aminoácidos derivada de la cadena ligera.

[0081] La secuencia enlazadora colocada entre la cadena ligera y la cadena pesada de la inmunoglobulina es una cadena peptídica que consiste de preferencia en 2 a 50, de más preferencia 8 a 50, aún de más preferencia 10 a 30, incluso de más preferencia 12 a 18 o 15 a 25 y, por ejemplo, 15 o 25 aminoácidos. Si bien no hay una limitación específica en lo que se refiere a la secuencia enlazadora, en la medida en que el anticuerpo anti-hTfR elaborado de ambas cadenas, que se enlazan mediante el enlazador, retenga la afinidad por hTfR y una proteína diferente (A) enlazada al anticuerpo también exhiba la actividad fisiológica propia de la proteína bajo una condición fisiológica, el enlazador de preferencia se compone de glicina, o glicina y serina. Los ejemplos de estos enlazadores incluyen la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly) (SEQ ID NO: 5), o una secuencia que incluye 2 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de estas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Una modalidad preferida de esta secuencia enlazadora comprende 15 aminoácidos que consiste en tres copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de

aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0082] En el caso donde el anticuerpo anti-hTfR es un anticuerpo de cadena sencilla, un ejemplo de modalidades específicas de la proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado de la presente invención y una proteína diferente (A) es una proteína de fusión que consiste en la proteína diferente (A) que se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una primera secuencia enlazadora que consiste en 27 aminoácidos compuesta de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), al anticuerpo de cadena sencilla. Un ejemplo de una modalidad preferida de anticuerpos de cadena sencilla empleados aquí es un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 277, la cual se compone de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR definida como SEQ ID NO: 205 que se enlaza, en el extremo C terminal de la misma y mediante una primera secuencia enlazadora que consiste en 15 aminoácidos, que consiste en tres copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), a la región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 191.

[0083] Donde el anticuerpo anti-hTfR es un anticuerpo de cadena sencilla, esta proteína de fusión puede producirse, por ejemplo, al transformar células hospedadoras, tales como células de mamífero, con un vector de expresión que tiene un fragmento de DNA incorporado que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de

fusión, y luego cultivar las células hospedadoras.

[0084] Por otra parte, en la presente invención, cuando una cadena peptídica incluye una pluralidad de secuencias enlazadoras, cada una de esas secuencias enlazadoras se designa, a partir del lado N terminal, la primera secuencia enlazadora, la segunda secuencia enlazadora, etcétera, por conveniencia.

[0085] En el caso donde el anticuerpo anti-hTfR es Fab, un ejemplo de modalidades específicas de la proteína de fusión entre un anticuerpo anti-hTfR humanizado y una proteína diferente (A) de la presente invención es una proteína de fusión que se compone de la proteína diferente (A) que se fusiona, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora que consiste en 27 aminoácidos compuesta de Gly-Ser seguidos por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), a una región que tiene la región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR y la región C_H1. Si bien parte de la región de la bisagra puede incluirse además de la región C_H1 aquí, la región de la bisagra no incluye ningún residuo de cisteína que pudiera formar un enlace disulfuro entre las cadenas pesadas.

[0086] Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la proteína diferente (A) a enlazarse al anticuerpo anti-hTfR, es una proteína que puede exhibir su actividad fisiológica en el cuerpo y, en particular, una proteína que necesita obtener acceso al cerebro y exhibir su función ahí pero, debido a su incapacidad para pasar a través de la barrera hematoencefálica tal como está, no puede esperarse que funcione en el cerebro si simplemente se administra por vía intravenosa.

Los ejemplos de estas proteínas incluyen enzimas lisosómicas tales como factor de crecimiento nervioso (NGF), α-L-iduronidasa, iduronato 2-sulfatasa, glucocerebrosidasa, β-galactosidasa, proteína activadora de GM2, β-hexosaminidasa A, β-hexosaminidasa B, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, α-manosidasa, β-manosidasa, galactosilceramidasa, saposina C, arilsulfatasa A, α-L-fucosidasa, aspartilglucosaminidasa, α-N-acetilgalactosaminidasa, esfingomielinasa ácida, α-galactosidasa A, β-glucuronidasa, heparán N-sulfatasa, α-N-acetilglucosaminidasa, acetil CoA:α-glucosaminida N-acetiltransferasa, N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, ceramidasa ácida, amilo-1,6-glucosidasa, sialidasa, aspartilglucosaminidasa (PPT1), tripeptidil-peptidasa 1, hialuronidasa 1, CLN1, CLN2 y similares.

[0087] El factor de crecimiento nervioso (NGF) enlazado al anticuerpo anti-hTfR puede utilizarse como agente terapéutico para demencia en la enfermedad de Alzheimer; la α-L-iduronidasa enlazada al anticuerpo anti-hTfR como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en el síndrome de Hurler o síndrome de Hurler-Scheie; la iduronato 2-sulfatasa enlazada al anticuerpo anti-hTfR como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en el síndrome de Hunter; la glucocerebrosidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Gaucher; la β-galactosidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en gangliosidosis GM1 Tipos 1 a 3; la proteína activadora de GM2 como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en gangliosidosis GM, variante AB; la

β-hexosaminidasa A como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Sandhoff y enfermedad de Tay-Sachs; la β-hexosaminidasa B como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Sandhoff; la N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de células I; la α-manosidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la α-manosidosis; la β-manosidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la β-manosidosis; la galactosilceramidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Krabbe; saposina C como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de almacenamiento tipo enfermedad de Gaucher; la arilsulfatasa A como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la degeneración de materia blanca metacromática (leucodistrofia metacromática); la α-L-fucosidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la fucosidosis; la aspartilglucosaminidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la aspartilglucosaminuria; la α-N-acetilgalactosaminidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Schindler y enfermedad de Kawasaki; la esfingomielinasa ácida como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Niemann-Pick; la α-galactosidasa A como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Fabry; la β-glucuronidasa como agente terapéutico para

trastornos del sistema nervioso central en el síndrome de Sly; la heparán N-sulfatasa, α-N-acetilglucosaminidasa, acetil CoA:α-glucosaminida N-acetiltransferasa y N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa como agentes terapéuticos para trastornos del sistema nervioso central en el síndrome de Sanfilippo; ceramidasa ácida como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Farber; la amilo-1,6-glucosidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Cori (enfermedad de Forbes-Cori); la sialidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la deficiencia de sialidasa; la aspartilglucosaminidasa como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la aspartilglucosaminuria; la palmitoil proteína tioesterasa 1 (PPT-1) como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en lipofuscinosis ceroidea neuronal o enfermedad de Santavuori-Haltia; la tripeptidil-peptidasa 1 (TPP-1) como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la lipofuscinosis ceroidea neuronal o enfermedad de Jansky-Bielschowsky; la hialuronidasa 1 como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en la deficiencia de hialuronidasa; CLN1 y CLN2 como agentes terapéuticos para trastornos del sistema nervioso central en la enfermedad de Batten. En particular, el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, después de pasar a través de la barrera hematoencefálica, alcanza el parénquima cerebral y la células de tipo neuronal del hipocampo del cerebro, y las células de Purkinje del cerebelo, y se espera además que alcance las células de tipo neuronal del cuerpo estriado del cerebro y las células de tipo neuronal

de la sustancia negra del mesencéfalo. Por lo tanto, el anticuerpo anti-hTfR puede fusionarse con proteínas que necesitan exhibir sus funciones en esos tejidos o células para potenciar los efectos farmacológicos de las proteínas. Las aplicaciones médicas de ello, sin embargo, no se limitan a las mismas.

[0088] Más aún, los ejemplos de proteínas que pueden exhibir sus efectos farmacológicos cuando se enlazan al anticuerpo anti-hTfR incluyen: enzimas lisosómicas, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF), neurotrofina 3, neurotrofina 4/5, neurotrofina 6, neuregulina 1, eritropoyetina, darbepoyetina, activina, factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interferón α, interferón β, interferón γ, interleucina 6, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), citocinas, receptor del factor de necrosis tumoral α (receptor de TNF-α), ligandos de PD-1, enzimas que tienen actividad de degradación de amiloides β, anticuerpo anti-amiloide β, anticuerpo anti-BACE, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-TNF-α y otros anticuerpos medicinales.

[0089] Las enzimas lisosómicas enlazadas al anticuerpo anti-hTfR pueden utilizarse como agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central en enfermedades de almacenamiento lisosómico; CNTF como agente terapéutico para esclerosis lateral amiotrófica;

GDNF, neurotrofina-3 y neurotrofina-4/5 como agentes terapéuticos para isquemia cerebral; GDNF como agente terapéutico para enfermedad de Parkinson; neuregulina-1 como agente terapéutico para esquizofrenia; eritropoyetina y darbepoyetina como agentes terapéuticos para isquemia cerebral; bFGF y FGF2 como agentes terapéuticos para trastornos traumáticos del sistema nervioso central; para recuperación después de cirugía cerebral y cirugía de médula espinal; enzimas que tienen actividad degradadora de β-amiloides, anticuerpo anti-β-amiloide y anticuerpo anti-BACE como agentes terapéuticos para enfermedad de Alzheimer; anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-PD-L1 y anticuerpo anti-HER2 como agentes terapéuticos para tumores del sistema nervioso central, incluyendo tumor cerebral; y TNFαR-anticuerpo anti-hTfR como agentes terapéuticos para una isquemia cerebral y encefalitis.

[0090] Los posibles candidatos para una "proteína diferente (A)" a fusionarse al anticuerpo anti-hTfR por lo general incluyen aquellos agentes terapéuticos para enfermedades tales como enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington; trastornos mentales tales como esquizofrenia y depresión; esclerosis múltiple; esclerosis lateral amiotrófica; tumores del sistema nervioso central incluyendo tumor cerebral; enfermedades de almacenamiento lisosómico acompañadas por encefalopatía; glucogenosis; distrofia muscular; isquemia cerebral; encefalitis; enfermedades por priones; trastornos traumáticos del sistema nervioso central. Además, un agente terapéutico para enfermedades virales y bacterianas del sistema

nervioso central también puede ser candidato para una proteína diferente (A) a fusionarse al anticuerpo anti-hTfR, en general. Más aún, los agentes farmacéuticos que pueden utilizarse para la recuperación después de cirugía cerebral o cirugía de médula espinal también pueden ser candidatos para una "proteína diferente (A)" a fusionarse al anticuerpo anti-hTfR, en general.

[0091] Además de las proteínas de tipo natural (de tipo silvestre) arriba mencionadas, una proteína diferente (A) a enlazarse al anticuerpo anti-hTfR también puede ser uno de sus análogos en los cuales uno o más aminoácidos de esas proteínas de tipo natural (de tipo silvestre) se modifican, por ejemplo, se reemplazan con otros aminoácidos o se eliminan, en la medida en que tengan completamente o en parte las funciones de sus proteínas originales respectivas. Cuando se reemplaza uno o más aminoácidos con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3. Cuando se elimina uno o más aminoácidos, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3. Una combinación de esta sustitución y eliminación de aminoácidos también puede llevarse a cabo para preparar análogos deseados. Más aún, las secuencias de aminoácidos producidas al adicionar uno o más aminoácidos dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de proteínas de tipo natural (de tipo silvestre) o sus análogos, también se incluyen en las proteínas arriba mencionadas en la medida en que tengan completamente o en parte las funciones de sus proteínas originales

respectivas. El número de aminoácidos a adicionarse aquí de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3. También es posible preparar análogos deseados para las proteínas originales al combinar la adición, sustitución y eliminación de aminoácidos.

[0092] Por otro lado, en el caso donde una mutación se introduce en una proteína diferente (A) al adicionar uno o más aminoácidos en su extremo C terminal o el extremo N terminal, si los aminoácidos adicionados se colocan entre la proteína y el anticuerpo anti-hTfR cuando se fusionan, los aminoácidos adicionados constituyen parte de un enlazador.

[0093] La I2S humana (hI2S) de tipo natural es una enzima lisosómica compuesta de 525 aminoácidos, definida como SEQ ID NO: 246. Un ejemplo específico de proteínas de fusión de la presente invención, entre el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A), es un tipo en el cual la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR se fusiona, en el extremo C terminal de la misma y mediante la secuencia de aminoácidos Gly-Ser como secuencia enlazadora, a la I2S humana de tipo natural. Los ejemplos de este tipo de proteínas de fusión incluyen:

(1) una cuya cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 164, y cuya cadena pesada, enlazada por enlace peptídico en el lado C terminal de la misma y mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser a I2S humana, forma la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 247,

(2) una cuya cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 180, y cuya cadena pesada,

enlazada por enlace peptídico en el lado C terminal de la misma y mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser a I2S humana, forma la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 249, y

(3) una cuya cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196, y cuya cadena pesada, enlazada por enlace peptídico en el lado C terminal de la misma y mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser a I2S humana, forma la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 251.

[0094] En la presente invención, si bien el término "I2S humana" o "hI2S" se refiere en particular a la hI2S que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la hI2S de tipo natural, también incluye aquellas secuencias de aminoácidos producidas al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición y similares, en la secuencia de aminoácidos de la hI2S de tipo natural, en la medida en que tengan la actividad de I2S. Cuando se reemplaza uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hI2S con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 a 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hI2S, el número de aminoácidos a eliminarse es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a hI2S, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de hI2S, y el

número de aminoácidos a adicionarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación del aminoácido. La secuencia de aminoácidos de la hI2S mutada tiene una homología de preferencia de no menos de 80%, de más preferencia no menos de 90%, aún de más preferencia no menos de 95% con la secuencia de aminoácidos de la hI2S original.

[0095] La afirmación de que hI2S tiene la actividad de I2S, en el presente documento, significa que la hI2S fusionada al anticuerpo anti-hTfR tiene una actividad no menor a 3% de la actividad que tiene la hI2S de tipo natural de manera intrínseca. Sin embargo, la actividad de preferencia no es menor a 10%, de más preferencia no menor a 20%, aún de más preferencia no menor a 50%, incluso de más preferencia no menor a 80% de la actividad que tiene la hI2S de tipo natural de manera intrínseca. Lo mismo también se aplica si la hI2S fusionada al anticuerpo anti-hTfR se muta.

[0096] La proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR y la I2S humana puede producirse, por ejemplo, al transformar células hospedadoras, tales como células de mamífero, con un vector de expresión que tiene un fragmento de DNA incorporado que comprende la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 250 que codifica la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 249, y un vector de expresión que tiene un fragmento de DNA incorporado que comprende la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 181 que codifica la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR que tiene la

secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 180, y luego cultivar las células hospedadoras. La proteína de fusión, producida de este modo, puede utilizarse como agente terapéutico para la enfermedad de Hunter, en particular, un agente terapéutico para los trastornos del sistema nervioso central que acompañan a la enfermedad de Hunter.

[0097] Por otro lado, en el caso donde el anticuerpo anti-hTfR o I2S humana se muta al adicionar uno o más aminoácidos a los mismos en el extremo C terminal o el extremo N terminal de los mismos, si los aminoácidos adicionados se colocan entre el anticuerpo anti-hTfR y la I2S humana, los aminoácidos adicionados constituyen parte de un enlazador.

[0098] Si bien arriba se describen ejemplos de proteínas de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR y la I2S humana, no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR en las modalidades preferidas de la proteína de fusión del anticuerpo anti-hTfR y la I2S humana, en la medida en que el anticuerpo tenga una afinidad específica por hTfR. Sin embargo, el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención exhibe una constante de disociación (K_D) con hTfR, al medirse por el método descrito en el Ejemplo 7, que de preferencia no es mayor a 1×10^{-8} M, de más preferencia no mayor a 1×10^{-9} M, aún de más preferencia no mayor a 1×10^{-10}. Por ejemplo, se prefiere uno que exhibe una constante de disociación de 1×10^{-13} M a 1×10^{-9} M o 1×10^{-13} M a 1×10^{-10} M. Lo mismo también se aplica cuando el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla. Más aún, en el caso donde el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención también tiene

una afinidad por TfR de mono, la constante de disociación del anticuerpo anti-hTfR con TfR de mono, al medirse por el método descrito en el Ejemplo 7, de preferencia no es mayor a 5 x 10^{-8} M, de más preferencia no mayor a 2 x 10^{-8} M, aún de más preferencia no mayor a 1 x 10^{-8} M. Por ejemplo, se prefiere uno que exhibe una constante de disociación de 1 x 10^{-13} M a 2 x 10^{-8} M. Lo mismo también se aplica cuando el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.

[0099] También es posible enlazar una cadena peptídica relativamente corta al anticuerpo anti-hTfR, de la misma manera que en el enlazamiento de una proteína diferente (A) al anticuerpo anti-hTfR. No hay limitación particular en lo que se refiere a una cadena peptídica a enlazarse al anticuerpo anti-hTfR, en la medida en que la cadena peptídica tenga una actividad fisiológica deseada. Por ejemplo, hay cadenas peptídicas que comprenden la secuencia de aminoácidos de esta región de diversas proteínas, que exhibe una actividad fisiológica. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la longitud de la cadena peptídica, se componen de preferencia de 2 a 200 aminoácidos, por ejemplo, de 5 a 50 aminoácidos.

[0100] En el enlazamiento de un compuesto de bajo peso molecular al anticuerpo anti-hTfR, no hay limitación particular en lo que se refiere a los compuestos de bajo peso molecular candidatos, pero son compuestos de bajo peso molecular de forma tal que, si bien necesitan entrar al cerebro y funcionar ahí, debido a su incapacidad para pasar a través de la barrera hematoencefálica tal como están, no puede esperarse que funcionen en el cerebro si simplemente se administran por vía

intravenosa. Los ejemplos de estos compuestos de bajo peso molecular incluyen fármacos anticancerosos tales como ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano, busulfano, tioTEPA, nimustina, ranimustina, dacarbazina, procarbazina, temozolomida, carmustina, estreptozocina, bendamustina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, 5-fluorouracilo, sulfadiazina, sulfametoxazol, metotrexato, trimetoprima, pirimetamina, fluorouracilo, flucitosina, azatioprina, pentostatina, hidroxiurea, fludarabina, citarabina, gemcitabina, irinotecano, doxorrubicina, etopósido, levofloxacina, ciprofloxacina, vinblastina, vincristina, paclitaxel, docetaxel, Mitomicina C, doxorrubicina, epirrubicina. Ejemplos adicionales de compuestos de bajo peso molecular a enlazarse al anticuerpo anti-hTfR incluyen siRNA, DNA antisentido y péptidos cortos.

[0101] En el enlazamiento entre el anticuerpo anti-hTfR y un compuesto de bajo peso molecular, un compuesto de bajo peso molecular puede enlazarse sólo ya sea a la cadena ligera o a la cadena pesada, o puede enlazarse tanto a la cadena ligera como a la cadena pesada, respectivamente. Más aún, en la medida en que tenga una afinidad por hTfR, el anticuerpo anti-hTfR puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad de parte de la región variable de cadena ligera y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad de parte de la región variable de cadena pesada.

[0102] Los candidatos para compuestos de bajo peso molecular a fusionarse con el anticuerpo anti-hTfR por lo general pueden ser aquellos agentes terapéuticos para enfermedades tales como enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de

Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington; trastornos mentales tales como esquizofrenia, depresión; esclerosis múltiple; esclerosis lateral amiotrófica; tumor del sistema nervioso central incluyendo tumor cerebral; enfermedades de almacenamiento lisosómico con encefalopatía acompañante; glucogenosis; distrofia muscular; isquemia cerebral; encefalitis; enfermedades por priones; trastornos traumáticos del sistema nervioso central. Más aún, los agentes terapéuticos para enfermedades virales y bacterianas del sistema nervioso central también pueden ser candidatos, en general, para compuestos de bajo peso molecular a fusionarse con el anticuerpo anti-hTfR. Más aún, aquellos agentes farmacéuticos que pueden utilizarse para recuperación después de cirugía cerebral o cirugía de médula espinal también pueden ser candidatos, en general, para compuestos de bajo peso molecular a fusionarse.

[0103] Si un anticuerpo anti-hTfR se origina de un animal no humano, su administración a el humano podría conllevar un riesgo sustancial de ocasionar una interacción antígeno-anticuerpo, lo que en consecuencia provoca efectos secundarios adversos. Al convertirlos a anticuerpos humanizados, la antigenicidad de los anticuerpos de animales no humanos puede reducirse y, por lo tanto, la provocación de efectos secundarios debido a la interacción antígeno-anticuerpo puede suprimirse cuando se administran a un humano. Más aún, se ha informado que, de acuerdo con experimentos utilizando monos, los anticuerpos humanizados son más estables que los anticuerpos de ratón en la sangre, y se espera que su efecto terapéutico, por lo tanto, pueda hacerse más duradero por consiguiente. La provocación de efectos

secundarios debido a una interacción antígeno-anticuerpo puede deprimirse también al emplear un anticuerpo humano como el anticuerpo anti-hTfR.

[0104] Una explicación detallada se ofrecerá a continuación respecto al caso donde el anticuerpo anti-hTfR es un anticuerpo humanizado o anticuerpo humano. En la cadena ligera de anticuerpo humano, hay cadenas λ y κ. La cadena ligera que constituye el anticuerpo humano puede ser cadena ya sea λ o κ. Y en la cadena pesada humana, hay cadenas γ, μ, α, σ y ε, las cuales corresponden a IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Si bien la cadena pesada que constituye el anticuerpo anti-hTfR puede ser cualquiera de las cadenas γ, μ, α, σ, y ε, se prefiere una cadena γ. Más aún, en la cadena γ de la cadena pesada humana, hay cadenas γ1, γ2, γ3 y γ4, las cuales corresponden a IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, respectivamente. En casos donde la cadena pesada que constituye el anticuerpo anti-hTfR es una cadena γ, si bien la cadena γ puede ser cualquiera de las cadenas γ1, γ2, γ3 y γ4, se prefiere una cadena γ1 o γ4. En el caso donde el anticuerpo anti-hTfR es un anticuerpo humanizado o anticuerpo humano e IgG, la cadena ligera de anticuerpo humano puede ser la cadena λ o cadena κ, y si bien la cadena pesada de anticuerpo humano puede ser la cadena γ1, γ2, γ3 y γ4, se prefiere una cadena γ1 o γ4. Por ejemplo, una modalidad preferible de anticuerpo anti-hTfR incluye uno cuya cadena ligera es una cadena λ y la cadena pesada es una cadena γ1.

[0105] En el caso donde el anticuerpo anti-hTfR es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) pueden unirse en conjunto al enlazar el anticuerpo

anti-hTfR, en el extremo N terminal (o el extremo C terminal) de la cadena pesada o cadena ligera, mediante una secuencia enlazadora o directamente, al extremo C terminal (o al extremo N terminal), respectivamente, de la proteína diferente (A) por enlaces peptídicos. Cuando se enlaza la proteína diferente (A) a la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR en el lado N terminal (o al lado C terminal) de la misma, el extremo C terminal (o el extremo N terminal), respectivamente, de la proteína diferente (A) se enlaza al extremo N terminal (o al extremo C terminal) de la cadena γ, μ, α, σ o ε del anticuerpo anti-hTfR, mediante una secuencia enlazadora o directamente, por enlaces peptídicos. Cuando se enlaza la proteína diferente (A) a la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR en el lado N terminal (o el lado C terminal) de la misma, el extremo C terminal (o el extremo N terminal), respectivamente, de la proteína diferente (A) se enlaza al extremo N terminal (o al extremo C terminal) de la cadena λ y cadena κ del anticuerpo anti-hTfR, mediante una secuencia enlazadora o directamente, por enlaces peptídicos. Sin embargo, en el caso donde el anticuerpo anti-hTfR consiste en la región Fab, o en la región Fab y la totalidad o parte de la región de la bisagra (Fab, $F(ab')_2$ y F(ab')), la proteína diferente (A) puede enlazarse en el extremo C terminal (o el extremo N terminal) de la misma, y mediante una secuencia enlazadora o directamente, al extremo N terminal (o al extremo C terminal), respectivamente, de la cadena pesada o cadena ligera que constituye Fab, $F(ab')_2$ y F(ab'), por enlaces peptídicos.

[0106] En una proteína de fusión producida al enlazar la proteína diferente (A) a la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR, el cual es un

anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano, en el lado C terminal de la misma, el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera y la secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada. La cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR y la proteína diferente (A) aquí pueden enlazarse directamente o mediante un enlazador.

[0107] En una proteína de fusión producida al enlazar la proteína diferente (A) a la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR, el cual es un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano, en el lado C terminal de la misma, el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera y la secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada. La cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR y la proteína diferente (A) aquí pueden enlazarse directamente o mediante un enlazador.

[0108] En una proteína de fusión producida al enlazar la proteína diferente (A) a la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR, el cual es un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano, en el lado N terminal de la misma, el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera y la secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada. La cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR y la proteína

diferente (A) aquí pueden enlazarse directamente o mediante un enlazador.

[0109] En una proteína de fusión producida al enlazar la proteína diferente (A) a la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR, el cual es un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano, en el lado N terminal de la misma, el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de la región variable de cadena ligera y la secuencia de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de la región variable de cadena pesada. La cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR y la proteína diferente (A) aquí pueden enlazarse directamente o mediante un enlazador.

[0110] Cuando se coloca una secuencia enlazadora entre el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A), la secuencia enlazadora de preferencia es una cadena peptídica que consiste en 1 a 50 aminoácidos, si bien el número de los aminoácidos que constituyen esta secuencia enlazadora puede ajustarse según se desee en concordancia con la proteína diferente (A) a enlazarse al anticuerpo anti-hTfR, como 1 a 17, 1 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29, etcétera. Aunque no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos específica de esta secuencia enlazadora, en la medida en que el anticuerpo anti-hTfR y la proteína diferente (A), enlazados por la secuencia enlazadora, retengan sus funciones respectivas (afinidad por hTfR y actividad o función bajo una condición fisiológica), de preferencia se compone de glicina o serina, por ejemplo, una que consiste en un solo aminoácido ya sea glicina o serina, la secuencia de

aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5) o una secuencia que incluye 1 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Por ejemplo, de preferencia se utiliza una secuencia enlazadora que comprende 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0111] Por otro lado, cuando se afirma aquí que una proteína diferente (A), fusionada con el anticuerpo anti-hTfR, retiene su actividad o función bajo una condición fisiológica o simplemente "retiene la actividad", significa que, en comparación con la actividad intrínseca del tipo natural de la proteína diferente (A), se retiene no menos de 3% de la actividad o función. Sin embargo, esta actividad o función de preferencia no es menor a 10%, de más preferencia no menor a 20%, aún de más preferencia no menor a 50%, e incluso de más preferencia no menor a 80%, en comparación con la actividad intrínseca del tipo natural de la proteína diferente (A). Lo mismo también se aplica en casos donde la proteína diferente (A), fusionada con el anticuerpo anti-hTfR, es una mutada.

[0112] Un ejemplo adicional de modalidades específicas de la proteína de fusión entre un anticuerpo anti-hTfR humanizado y una proteína diferente (A), de la presente invención, es una producida al fusionar la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR, en el lado C terminal de la

misma, con una proteína diferente (A) mediante una secuencia enlazadora que consiste en 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0113] En el caso donde el anticuerpo anti-hTfR es Fab, un ejemplo de modalidades específicas de proteínas de fusión entre un anticuerpo anti-hTfR humanizado de la presente invención y una proteína diferente (A) es una producida al fusionar una proteína diferente (A), en el lado C terminal de la misma mediante una secuencia enlazadora, con la región que consiste en la región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR y su región C_H1 acompañante, en donde la secuencia enlazadora consiste en 27 aminoácidos y se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3). Si bien también se permite aquí que parte de la región de la bisagra también sea además la región C_H1, la región de la bisagra no contiene un residuo de cisteína que pudiera formar un enlace disulfuro entre cadenas pesadas.

[0114] La afinidad específica del anticuerpo anti-hTfR por hTfR reside principalmente en las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR. No hay limitación particular en lo que se refiere a las secuencias de aminoácidos de esas CDR en la medida en que el anticuerpo anti-hTfR tenga una afinidad específica por hTfR. Sin embargo, el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención es uno cuya constante de disociación

(K_D) con hTfR, al medirse por el método descrito en el Ejemplo 7, de preferencia no es mayor a 1 x 10^{-8} M, de más preferencia no mayor a 1 x 10^{-9} M, aún de más preferencia no mayor a 1 x 10^{-10} M, e incluso de más preferencia no mayor a 1 x 10^{-11} M. Por ejemplo, uno que tiene una constante de disociación de 1 x 10^{-13} M a 1 x 10^{-9} M, o 1 x 10^{-13} M a 1 x 10^{-10} M es preferible. Lo mismo también se aplica cuando el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla. Más aún, en casos donde el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención tiene afinidad también por TfR de mono, la constante de disociación del anticuerpo anti-hTfR con TfR de mono, al medirse por el método descrito en el Ejemplo 7, de preferencia no es mayor a 5 x 10^{-8} M, de más preferencia no mayor a 2 x 10^{-8} M, y aún de más preferencia no mayor a 1 x 10^{-8} M. Por ejemplo, se prefiere uno que exhibe una constante de disociación de 1 x 10^{-13} M a 2 x 10^{-8} M. Lo mismo también se aplica si el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.

[0115] Los ejemplos de las modalidades preferibles del anticuerpo, que tiene afinidad por hTfR, incluyen aquellas cuyas CDR de cadenas ligeras tienen secuencias de aminoácidos de acuerdo con uno de (1) a (14) a continuación:

(1) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o la secuencia de aminoácidos Trp-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 como CDR3;

(2) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida

como SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 como CDR3;

(3) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o la secuencia de aminoácidos Lys-Val-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 como CDR3;

(4) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 como CDR3;

(5) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 como CDR3;

(6) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 como CDR3;

(7) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39 o la secuencia de aminoácidos

Gln-Th-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 como CDR3;

(8) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44 o la secuencia de aminoácidos Gly-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 como CDR3;

(9) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 49 o la secuencia de aminoácidos Phe-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 como CDR3;

(10) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 como CDR3;

(11) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 57 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 60 como CDR3;

(12) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64 o la secuencia de aminoácidos Trp-Ser-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como

SEQ ID NO: 65 como CDR3;

(13) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70 como CDR3; y

(14) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 o SEQ ID NO: 74 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 como CDR3.

[0116] Los ejemplos de las modalidades más específicas del anticuerpo, que tiene afinidad por hTfR, incluyen aquellas cuyas CDR de cadenas ligeras tienen secuencias de aminoácidos de acuerdo con uno de (1) a (14) a continuación:

(1) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 como CDR1; SEQ ID NO: 8 como CDR2; y SEQ ID NO: 10 como CDR3;

(2) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 como CDR1; SEQ ID NO: 13 como CDR2; y SEQ ID NO: 15 como CDR3;

(3) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 como CDR1; SEQ ID NO: 18 como CDR2; y SEQ ID NO: 20 como CDR3;

(4) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 como CDR1; SEQ ID NO: 23 como CDR2; y SEQ ID NO: 25 como

CDR3;

(5) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 como CDR1; SEQ ID NO: 28 como CDR2; y SEQ ID NO: 30 como CDR3;

(6) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 como CDR1; SEQ ID NO: 33 como CDR2; y SEQ ID NO: 35 como CDR3;

(7) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 como CDR1; SEQ ID NO: 38 como CDR2; y SEQ ID NO: 40 como CDR3;

(8) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 como CDR1; SEQ ID NO: 43 como CDR2; y SEQ ID NO: 45 como CDR3;

(9) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 como CDR1; SEQ ID NO: 48 como CDR2; y SEQ ID NO: 50 como CDR3;

(10) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 como CDR1; SEQ ID NO: 53 como CDR2; y SEQ ID NO: 55 como CDR3;

(11) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 como CDR1; SEQ ID NO: 58 como CDR2; y SEQ ID NO: 60 como CDR3;

(12) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 como CDR1; SEQ ID NO: 63 como CDR2; y SEQ ID NO: 65 como CDR3;

(13) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66

como CDR1; SEQ ID NO: 68 como CDR2; y SEQ ID NO: 70 como CDR3; y

(14) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 como CDR1; SEQ ID NO: 73 como CDR2; y SEQ ID NO: 75 como CDR3;

[0117] Los ejemplos de las modalidades preferibles del anticuerpo, que tiene afinidad por hTfR, incluyen aquellas cuyas CDR de cadenas pesadas tienen secuencias de aminoácidos de acuerdo con uno de (1) a (14) a continuación:

(1) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80 o SEQ ID NO: 81 como CDR3;

(2) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 85 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 87 como CDR3;

(3) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 89 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 91 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 93 como CDR3;

(4) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 95 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida

como SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 o SEQ ID NO: 99 como CDR3;

(5) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 o SEQ ID NO: 101 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 103 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 105 como CDR3;

(6) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 107 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 108 o SEQ ID NO: 278 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 110 como CDR3;

(7) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 112 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 114 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 116 como CDR3;

(8) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 118 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 279 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 121 como CDR3;

(9) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 o SEQ ID NO: 125 como CDR2; y la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 o SEQ ID NO: 127 como CDR3;

(10) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131 como CDR2; y SEQ ID NO: 132 o SEQ ID NO: 133 como CDR3;

(11) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 o SEQ ID NO: 135 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 136 o SEQ ID NO: 137 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 o SEQ ID NO: 139 como CDR3;

(12) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 o SEQ ID NO: 145 como CDR3;

(13) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 147 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 149 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 150 o SEQ ID NO: 151 como CDR3; y

(14) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 o SEQ ID NO: 153 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 o SEQ ID NO: 155 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 o SEQ ID NO: 157 como CDR3.

[0118] Los ejemplos de las modalidades más específicas del anticuerpo, que tiene afinidad por hTfR, incluyen aquellas cuyas CDR de cadenas pesadas tienen secuencias de aminoácidos de acuerdo con uno de (1) a (14) a continuación:

(1) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 como CDR1; SEQ ID NO: 78 como CDR2; y SEQ ID NO: 80 como CDR3;

(2) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 como CDR1; SEQ ID NO: 84 como CDR2; y SEQ ID NO: 86 como CDR3;

(3) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 como CDR1; SEQ ID NO: 90 como CDR2; y SEQ ID NO: 92 como CDR3;

(4) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 como CDR1; SEQ ID NO: 96 como CDR2; y SEQ ID NO: 98 como CDR3;

(5) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 como CDR1; SEQ ID NO: 102 como CDR2; y SEQ ID NO: 104 como CDR3;

(6) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 como CDR1; SEQ ID NO: 108 como CDR2; y SEQ ID NO: 109 como CDR3;

(7) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 como CDR1; SEQ ID NO: 113 como CDR2; y SEQ ID NO: 115 como CDR3;

(8) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117

como CDR1; SEQ ID NO: 119 como CDR2; y SEQ ID NO: 120 como CDR3;

(9) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 como CDR1; SEQ ID NO: 124 como CDR2; y SEQ ID NO: 126 como CDR3;

(10) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 como CDR1; SEQ ID NO: 130 como CDR2; y SEQ ID NO: 132 como CDR3;

(11) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 como CDR1; SEQ ID NO: 136 como CDR2; y SEQ ID NO: 138 como CDR3;

(12) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 como CDR1; SEQ ID NO: 142 como CDR2; y SEQ ID NO: 144 como CDR3;

(13) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 como CDR1; SEQ ID NO: 148 como CDR2; y SEQ ID NO: 150 como CDR3; y

(14) la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 como CDR1; SEQ ID NO: 154 como CDR2; y SEQ ID NO: 156 como CDR3.

[0119] Los ejemplos de combinaciones preferibles de la cadena ligera y cadena pesada, del anticuerpo que tiene afinidad por hTfR, incluyen aquellas que tienen las secuencias de aminoácidos como las CDR de acuerdo con (1) a (14) a continuación:

(1) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida

como SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o la secuencia de aminoácidos Trp-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80 o SEQ ID NO: 81 como CDR3;

(2) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o la secuencia de aminoácidos Tyr Ala Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 85 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 87 como CDR3;

(3) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o la secuencia de aminoácidos Lys-Val-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 89 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 91 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 93 como CDR3;

(4) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 95 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 o SEQ ID NO: 99 como CDR3;

(5) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 como CDR3;

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 o SEQ ID NO: 101 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 103 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID

NO: 104 o SEQ ID NO: 105 como CDR3;

(6) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 107 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 108 o SEQ ID NO: 278 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 110 como CDR3;

(7) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39 o la secuencia de aminoácidos Gln-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 112 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 114 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 116 como CDR3;

(8) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42 como CDR1; la secuencia de

aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44 o la secuencia de aminoácidos Gly-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 118 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 279 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 121 como CDR3;

(9) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 49 o la secuencia de aminoácidos Phe-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 o SEQ ID NO: 125 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 o SEQ ID NO: 127 como CDR3;

(10) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida

como SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 132 o SEQ ID NO: 133 como CDR3;

(11) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 57 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 60 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 o SEQ ID NO: 135 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 136 o SEQ ID NO: 137 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 o SEQ ID NO: 139 como CDR3;

(12) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64 o la secuencia de aminoácidos Trp-Ser-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 65 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 o SEQ ID NO: 145 como CDR3;

(13) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 147 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 149 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 150 o SEQ ID NO: 151 como CDR3;

(14) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 o SEQ ID NO: 74 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 o SEQ ID NO: 153 como CDR1; la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 o SEQ ID NO: 155 como CDR2; y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 o SEQ ID NO: 157 como CDR3.

[0120] Los ejemplos de modalidades específicas de combinaciones de la cadena ligera y cadena pesada, del anticuerpo que tiene afinidad por hTfR, incluyen aquellas que tienen las secuencias de aminoácidos como las CDR de acuerdo con uno de (1) a (14) a continuación:

(1) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 como CDR1; SEQ ID NO: 8 como CDR2; y SEQ ID NO: 10 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 como CDR1; SEQ ID NO: 78 como CDR2; y SEQ ID NO: 80 como CDR3;

(2) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 como CDR1; SEQ ID NO: 13 como CDR2; y SEQ ID NO: 15 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 como CDR1; SEQ ID NO: 84 como CDR2; y SEQ ID NO: 86 como CDR3;

(3) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 como CDR1; SEQ ID NO: 18 como CDR2; y SEQ ID NO: 20 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 como CDR1; SEQ ID NO: 90 como CDR2; y SEQ ID NO: 92 como CDR3;

(4) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 como CDR1; SEQ ID NO: 23 como CDR2; y SEQ ID NO: 25 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida

como SEQ ID NO: 94 como CDR1; SEQ ID NO: 96 como CDR2; y SEQ ID NO: 98 como CDR3;

(5) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 como CDR1; SEQ ID NO: 28 como CDR2; y SEQ ID NO: 30 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 como CDR1; SEQ ID NO: 102 como CDR2; y SEQ ID NO: 104 como CDR3;

(6) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 como CDR1; SEQ ID NO: 33 como CDR2; y SEQ ID NO: 35 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 como CDR1; SEQ ID NO: 108 como CDR2; y SEQ ID NO: 109 como CDR3;

(7) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 como CDR1; SEQ ID NO: 38 como CDR2; y SEQ ID NO: 40 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 como CDR1; SEQ ID NO: 113 como CDR2; y SEQ ID NO: 115 como CDR3;

(8) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 como CDR1; SEQ ID NO: 43 como CDR2; y

SEQ ID NO: 45 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 como CDR1; SEQ ID NO: 119 como CDR2; y SEQ ID NO: 120 como CDR3;

(9) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 como CDR1; SEQ ID NO: 48 como CDR2; y SEQ ID NO: 50 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 como CDR1; SEQ ID NO: 124 como CDR2; y SEQ ID NO: 126 como CDR3;

(10) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 como CDR1; SEQ ID NO: 53 como CDR2; y SEQ ID NO: 55 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 como CDR1; SEQ ID NO: 130 como CDR2; y SEQ ID NO: 132 como CDR3;

(11) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 como CDR1; SEQ ID NO: 58 como CDR2; y SEQ ID NO: 60 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 como CDR1; SEQ ID NO: 136 como CDR2; y SEQ ID NO: 138 como CDR3;

(12) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 como CDR1; SEQ ID NO: 63 como CDR2; y SEQ ID NO: 65 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 como CDR1; SEQ ID NO: 142 como CDR2; y SEQ ID NO: 144 como CDR3;

(13) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 como CDR1; SEQ ID NO: 68 como CDR2; y SEQ ID NO: 70 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 como CDR1; SEQ ID NO: 148 como CDR2; y SEQ ID NO: 150 como CDR3; y

(14) una combinación de

la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 como CDR1; SEQ ID NO: 73 como CDR2; y SEQ ID NO: 75 como CDR3; y

la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 como CDR1; SEQ ID NO: 154 como CDR2; y SEQ ID NO: 156 como CDR3.

[0121] Como modalidades preferidas de anticuerpos humanizados que tienen afinidad por hTfR, hay anticuerpos humanizados producidos al utilizar las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TfR humano de ratón definidas como SEQ ID NO: 218 a SEQ ID NO: 245 como las CDR. Los anticuerpos humanizados se producen al

reemplazar las posiciones apropiadas de un anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las CDR de la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TfR humano de ratón.

[0122] Por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las correspondientes a las CDR de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 34 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 218 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 56 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 218 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 89 a 97 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 218 como CDR3, y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las correspondientes a las CDR de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 219 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 219 como CDR2; con una

secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 7, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 105 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 219 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0123] Además, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 34 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 220 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 56 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 220 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 89 a 97 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 220 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las correspondientes a las CDR de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 221 como CDR1; con una secuencia de

aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 221 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 14, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 112 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 221 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0124] Más aún, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 11, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 39 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 222 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 55 a 61 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 222 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 94 a 102 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 222 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una

secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 223 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 223 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 9, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 107 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 223 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0125] Más aún, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 5, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 33 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 224 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 49 a 55 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 224 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 88 a 96 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 224 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 225 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 51 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 225 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 13, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 111 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 225 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0126] Más aún, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 5, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 33 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 226 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 49 a 55 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 226 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que

consiste en no menos de 3, o no menos de 7, aminoácidos consecutivos en las posiciones 88 a 95 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 226 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 227 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 51 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 227 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 9, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 107 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 227 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0127] Además, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 34 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 228 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que

consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 56 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 228 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 89 a 97 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 228 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 229 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 7, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 65 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 229 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 4, aminoácidos consecutivos en las posiciones 96 a 101 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 229 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0128] Más aún, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en

no menos de 3, o no menos de 5, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 33 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 230 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 49 a 55 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 230 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 88 a 96 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 230 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 231 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 51 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 231 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 11, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 109 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 231 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0129] Más aún, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo

humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 5, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 33 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 232 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 49 a 55 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 232 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 88 a 96 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 232 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 233 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 7, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 65 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 233 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 4, aminoácidos consecutivos en las posiciones 96 a 101 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 233 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo

humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0130] Más aún, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 5, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 33 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 234 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 49 a 55 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 234 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 88 a 96 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 234 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 235 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 51 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 235 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 106 de la

secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 235 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0131] Además, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 34 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 236 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 56 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 236 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 89 a 97 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 236 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 237 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 51 a 66 de la secuencia de

aminoácidos definida como SEQ ID NO: 237 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 11, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 109 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 237 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0132] Además, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 34 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 238 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 56 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 238 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 89 a 97 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 238 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos

definida como SEQ ID NO: 239 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 51 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 239 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 9, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 107 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 239 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0133] Además, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 34 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 240 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 56 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 240 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 89 a 97 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 240 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR

correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 241 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 51 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 241 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 10, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 108 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 241 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0134] Además, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 34 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 242 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 50 a 56 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 242 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 89 a 97 de la secuencia de aminoácidos definida como

SEQ ID NO: 242 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 243 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 51 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 243 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 9, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 107 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 243 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0135] Más aún, por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena ligera de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 5, aminoácidos consecutivos en las posiciones 24 a 33 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 244 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 6, aminoácidos consecutivos en las posiciones 49 a 55 de la secuencia de aminoácidos definida como

SEQ ID NO: 244 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 9, aminoácidos consecutivos en las posiciones 88 a 96 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 244 como CDR3; y

la cadena pesada de un anticuerpo humanizado puede producirse al reemplazar las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de la cadena pesada de un anticuerpo humano con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3 aminoácidos consecutivos en las posiciones 26 a 35 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 245 como CDR1; con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 8, aminoácidos consecutivos en las posiciones 51 a 66 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 245 como CDR2; y con una secuencia de aminoácidos que consiste en no menos de 3, o no menos de 9, aminoácidos consecutivos en las posiciones 97 a 107 de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 245 como CDR3.

Al combinar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado, obtenido de este modo, el anticuerpo humanizado puede prepararse.

[0136] Los ejemplos de las modalidades preferidas del anticuerpo humanizado, que tiene afinidad por hTfR, incluyen aquellas que tienen una secuencia de aminoácidos de acuerdo con uno de (1) a (3) a continuación:

(1) Un anticuerpo anti-hTfR,

en donde la región variable de cadena ligera del mismo

comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 y SEQ ID NO: 163, y

en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 y SEQ ID NO: 171.

(2) un anticuerpo anti-hTfR,

en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende cualquier secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 y SEQ ID NO: 179, y

en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende cualquier secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 y SEQ ID NO: 187.

(3) anticuerpo anti-hTfR,

en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 y SEQ ID NO: 195, y

en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el

grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 y SEQ ID NO: 209.

[0137] Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, definidas como SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 y SEQ ID NO: 163, comprenden la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 o 7 en CDR1; SEQ ID NO: 8 o 9 en CDR2; y SEQ ID NO: 10 en CDR3. Sin embargo, el término CDR, como se utiliza arriba con respecto a las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, definidas como SEQ ID NOs: 158 a 162, no se limita a esas secuencias específicas, sino también puede incluir una región que contiene las secuencias de aminoácidos de una de las CDR o incluir una secuencia de aminoácidos que comprende no menos de 3 aminoácidos consecutivos de una de las CDR anteriores.

[0138] Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, definidas como SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 y SEQ ID NO: 171, comprenden la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 o 77 en CDR1; SEQ ID NO: 78 o 79 en CDR2; y SEQ ID NO: 80 u 81 en CDR3. Sin embargo, el término CDR, utilizado arriba con respecto a las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, definidas como SEQ ID NOs: 166 a 171, no se limita a esas secuencias específicas, sino también puede incluir una región que contiene las secuencias de aminoácidos de una de las CDR o incluir una secuencia de aminoácidos que comprende no menos de 3 aminoácidos

consecutivos de una de las CDR anteriores.

[0139] Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, definidas como SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 y SEQ ID NO: 179, comprenden la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 o 12 en CDR1; SEQ ID NO: 13 o 14 en CDR2; y SEQ ID NO: 15 en CDR3. Sin embargo, el término CDR, como se utiliza arriba con respecto a las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, definidas como SEQ ID NOs: 174 a 179, no se limita a esas secuencias específicas, sino también puede incluir una región que contiene las secuencias de aminoácidos de una de las CDR o incluir una secuencia de aminoácidos que comprende no menos de 3 aminoácidos consecutivos de una de las CDR anteriores.

[0140] Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, definidas como SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 y SEQ ID NO: 187, comprenden la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 u 83 en CDR1; SEQ ID NO: 84 u 85 en CDR2; y SEQ ID NO: 86 u 87 en CDR3. Sin embargo, el término CDR, utilizado arriba con respecto a las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, definidas como SEQ ID NOs: 182 a 187, no se limita a esas secuencias específicas, sino también puede incluir una región que contiene las secuencias de aminoácidos de una de las CDR o incluir una secuencia de aminoácidos que comprende no menos de 3 aminoácidos consecutivos de una de las CDR anteriores.

[0141] Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena

ligera, definidas como SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 y SEQ ID NO: 195, comprenden la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 o 17 en CDR1; SEQ ID NO: 18 o 19 en CDR2; y SEQ ID NO: 20 en CDR3. Sin embargo, el término CDR, como se utiliza arriba con respecto a las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, definidas como SEQ ID NOs: 190 a 195, no se limita a esas secuencias específicas, sino también puede incluir una región que contiene las secuencias de aminoácidos de una de las CDR o incluir una secuencia de aminoácidos que comprende no menos de 3 aminoácidos consecutivos de una de las CDR anteriores.

[0142] Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, definidas como SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 y SEQ ID NO: 209, comprenden la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 u 89 en CDR1; SEQ ID NO: 90 o 91 en CDR2; y SEQ ID NO: 92 o 93 en CDR3. Sin embargo, el término CDR, utilizado arriba con respecto a las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada, definidas como SEQ ID NOs: 204 a 209, no se limita a esas secuencias específicas, sino también puede incluir una región que contiene las secuencias de aminoácidos de una de las CDR o incluir una secuencia de aminoácidos que comprende no menos de 3 aminoácidos consecutivos de una de las CDR anteriores.

[0143] Los ejemplos de modalidades más específicas del anticuerpo humanizado, que tiene afinidad por hTfR, incluyen:

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como

SEQ ID NO: 163 en la región variable de cadena ligera y comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 171 en la región variable de cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 179 en la región variable de cadena ligera y comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 187 en la región variable de cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 191 en la región variable de cadena ligera y comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205 en la región variable de cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 193 en la región variable de cadena ligera y comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205 en la región variable de cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 194 en la región variable de cadena ligera y comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205 en la región variable de cadena pesada, y

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 195 en la región variable de cadena ligera y comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205 en la región variable de cadena pesada.

[0144] Los ejemplos de modalidades más específicas del anticuerpo humanizado, que tiene afinidad por hTfR, incluyen:

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como

SEQ ID NO: 164 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 172 en la cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 180 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 188 en la cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 en la cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 198 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 en la cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 200 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 en la cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 202 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 en la cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212 en la cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 198 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212 en la cadena pesada,

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 200 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212 en la cadena pesada, y

el que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 202 en la cadena ligera y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212 en la cadena pesada.

[0145] Las modalidades preferidas del anticuerpo que tiene afinidad por hTfR se han ejemplificado arriba. La cadena ligera y cadena pesada de esos anticuerpos anti-hTfR pueden mutarse según se desee, por sustitución, eliminación, adición y similares, en sus secuencias de aminoácidos de regiones variables, con el fin de ajustar la afinidad del anticuerpo anti-hTfR por hTfR a un nivel adecuado.

[0146] Cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. La introducción de una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos también se permite.

[0147] Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a la región variable de cadena ligera, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera, y de preferencia 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2, en total. La introducción de una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también se permite. Esta secuencia de

aminoácidos de región variable de cadena ligera mutada tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera original.

[0148] En particular, cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de las CDR respectivas en la cadena ligera con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2, e incluso de más preferencia 1. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de las CDR respectivas, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2, e incluso de más preferencia 1. La introducción de una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos también se permite.

[0149] Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de las CDR respectivas en la cadena ligera, se adicionan dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos, y de preferencia 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2, en total. La introducción de una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también se permite. La secuencia de aminoácidos de cada una de estas CDR mutadas tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, y aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de las CDR originales respectivas.

[0150] Cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de

aminoácidos de región variable de cadena pesada con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. La introducción de una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos también se permite.

[0151] Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a la región variable de cadena pesada, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada, y de preferencia 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2, en total. La introducción de una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también se permite. Esta secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada mutada tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada original.

[0152] En particular, cuando se reemplaza uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de las CDR respectivas en la cadena pesada con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2, e incluso de más preferencia 1. Cuando se elimina uno o más

aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de las CDR respectivas, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2, e incluso de más preferencia 1. La introducción de una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos también se permite.

[0153] Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de las CDR respectivas en la cadena pesada, se adicionan dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos, y de preferencia 1 a 5, de más preferencia 1 a 3, aún de más preferencia 1 o 2, e incluso de más preferencia 1 en total. La introducción de una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación de aminoácidos también se permite. La secuencia de aminoácidos de cada una de estas CDR mutadas tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, y aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de las CDR originales respectivas.

[0154] En lo anterior, el reemplazo de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de región variable de anticuerpo anti-hTfR anterior, con otros aminoácidos, se ejemplifica por el intercambio entre aminoácidos ácidos, es decir, ácido aspártico y ácido glutámico; intercambio entre aminoácidos tipo amida, es decir, asparagina y glutamina; intercambio entre aminoácidos alcalinos, es decir, lisina y arginina, intercambio entre aminoácidos ramificados, es decir, valina, leucina e isoleucina; intercambio entre aminoácidos alifáticos, es decir, glicina y alanina; intercambio entre hidroxiaminoácidos, es decir, serina y treonina; e intercambio entre aminoácidos aromáticos, es decir,

fenilalanina y tirosina.

[0155] Por otro lado, en el caso donde la introducción de una mutación en el anticuerpo anti-hTfR, al adicionar uno o más aminoácidos en su extremo C terminal o el extremo N terminal, si los aminoácidos adicionados se colocan entre el anticuerpo anti-hTfR y una proteína diferente (A) cuando se fusionan, los aminoácidos adicionados constituyen parte de un enlazador.

[0156] En las modalidades preferidas anteriores del anticuerpo, incluyendo un anticuerpo humanizado, que tiene afinidad por hTfR, no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos de las CDR de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR, en la medida en que el anticuerpo tenga una afinidad específica por hTfR. Sin embargo, el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención exhibe una constante de disociación (K_D) con hTfR, al medirse por el método descrito en el Ejemplo 7, que de preferencia no es mayor a 1×10^{-8} M, de más preferencia no mayor a 1×10^{-9} M, aún de más preferencia no mayor a 1×10^{-9} M, e incluso de más preferencia no mayor a 1×10^{-9} M. Por ejemplo, se prefiere uno que exhibe una constante de disociación de 1×10^{-13} M a 1×10^{-9} M o 1×10^{-13} M a 1×10^{-10} M. Lo mismo se aplica cuando el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla. Más aún, en el caso donde el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención también tiene una afinidad también por un TfR de mono, la constante de disociación del anticuerpo anti-hTfR para el TfR de mono, al medirse por el método descrito en el Ejemplo 7, de preferencia no es mayor a 5×10^{-8} M, de más preferencia no mayor a 2×10^{-8} M, aún de más preferencia no mayor a 1×10^{-8} M.

Por ejemplo, se prefiere uno que exhibe una constante de disociación de 1×10^{-13} M a 2×10^{-8} M. Lo mismo se aplica cuando el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.

[0157] Las modalidades específicas de la proteína de fusión anterior entre el anticuerpo humanizado, el cual tiene afinidad por hTfR, y una proteína diferente (A), arriba descritos, incluyen: aquellas en las cuales la proteína diferente (A) es iduronato 2-sulfatasa humana (hI2S), eritropoyetina humana (hEPO), arilsulfatasa A humana (hARSA), PPT-1 humana (hPPT-1), TPP-1 humana (hTPP-1), α-L-iduronidasa humana (hIDUA), receptor de TNFα humano (hTNFαR),y heparán N-sulfatasa humana (hSGSH).

Los ejemplos específicos de la proteína de fusión, donde la proteína diferente (A) es hI2S, incluyen;

(1) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a hI2S, y la otra porción que consiste en la hTfR cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 247, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a hI2S, y la otra porción que consiste en la hTfR cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 249, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 180,

(3) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena

pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a hI2S, y la otra porción que consiste en la hTfR cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 251, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0158] En (1) arriba, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR, la cual se incluye en la SEQ ID NO: 247, es la definida como SEQ ID NO: 172. En particular, la proteína de fusión de acuerdo con (1) arriba incluye, como anticuerpo humanizado, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera definida como SEQ ID NO: 164 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada definida como SEQ ID NO: 172.

En (2) arriba, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR, la cual se incluye en la SEQ ID NO: 249, es la definida como SEQ ID NO: 188. En particular, la proteína de fusión de acuerdo con (2) arriba incluye, como anticuerpo humanizado, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera definida como SEQ ID NO: 180 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada definida como SEQ ID NO: 188.

En (3) arriba, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR, la cual se incluye en la SEQ ID NO: 251, es la definida como SEQ ID NO: 210. En particular, la proteína de fusión de acuerdo con (3) arriba incluye, como anticuerpo humanizado, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera definida como SEQ ID NO: 196 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada definida como SEQ ID NO: 210.

[0159] Los ejemplos específicos de la proteína de fusión, donde la proteína diferente (A) es eritropoyetina humana (hEPO), incluyen;

(1) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hEPO, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 172, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hEPO, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 188, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 180, y

(3) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hEPO, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 210, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0160] En cualquiera de (1) a (3) arriba citados, hEPO y la cadena pesada de hTfR pueden enlazarse por un enlace peptídico, ya sea directamente o mediante una secuencia enlazadora. En particular, en

cualquiera de (1) a (3) arriba citados, el significado de la frase “mediante un enlace peptídico” y el de la frase “directamente o mediante una secuencia enlazadora” son los mismos. La secuencia enlazadora empleada aquí consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos del enlazador, de preferencia se produce de glicina y serina: por ejemplo, un solo aminoácido, ya sea glicina o serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5), o una secuencia que consiste en 1 a 50 o 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29 o 27 aminoácidos que se componen de 1 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Ser puede utilizarse de preferencia como secuencia enlazadora. Más aún, de preferencia se utiliza una secuencia enlazadora que comprende 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0161] Modalidades más específicas de anticuerpo humanizado más hEPO incluyen la que se compone de la parte que consiste en hEPO enlazada, mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser, al lado C terminal de la cadena pesada de hTfR, y la otra parte que consiste en la cadena

ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 257, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0162] Por otro lado, en la presente invención, si bien el término "EPO humana" o "hEPO" se refiere en particular a la hEPO que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la hEPO de tipo natural, definida como SEQ ID NO: 256, también incluye aquellas secuencias de aminoácidos producidas al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición y similares, en la secuencia de aminoácidos de la hEPO de tipo natural, en la medida en que tengan la actividad de EPO. Cuando se reemplaza uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hEPO con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hEPO, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a hEPO, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de hEPO, y el número de aminoácidos a adicionarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta adición, sustitución

y eliminación del aminoácido. La secuencia de aminoácidos de cada una de estas hEPO mutadas tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, aún de más preferencia no menor a 95%, con la secuencia de aminoácidos de la hEPO original. La darbepoyetina es un ejemplo obtenido al mutar la hEPO de tipo natural.

[0163] Los ejemplos específicos de la proteína de fusión, donde la proteína diferente (A) es arilsulfatasa A humana (hARSA), incluyen;

(1) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hARSA, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 172, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hARSA, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 188, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 180, y

(3) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma mediante un enlace peptídico, a hARSA, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la

cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 210, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0164] En cualquiera de (1) a (3) arriba citados, hARSA y la cadena pesada de hTfR pueden enlazarse por un enlace peptídico, ya sea directamente o mediante una secuencia enlazadora. En particular, en cualquiera de (1) a (3) arriba citados, el significado de la frase "mediante un enlace peptídico" y el de la frase "directamente o mediante una secuencia enlazadora" son los mismos. La secuencia enlazadora empleada aquí consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos del enlazador, de preferencia se produce de glicina y serina: por ejemplo, un solo aminoácido, ya sea glicina o serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5), o una secuencia que consiste en 1 a 50 o 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29 o 27 aminoácidos que se componen de 1 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Ser puede utilizarse de preferencia como secuencia enlazadora. Más aún, de preferencia se utiliza una secuencia enlazadora que comprende 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas

consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0165] Modalidades más específicas de anticuerpo humanizado más hARSA incluyen la que se compone de la parte que consiste en hARSA enlazada, mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser, al lado C terminal de la cadena pesada de hTfR, y la otra parte que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 260, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0166] Por otro lado, en la presente invención, si bien el término "ARSA humana" o "hARSA" se refiere en particular a la hARSA que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la hARSA de tipo natural, definida como SEQ ID NO: 259, también incluye aquellas secuencias de aminoácidos producidas al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición y similares, en la secuencia de aminoácidos de la hARSA de tipo natural, en la medida en que tengan la actividad de ARSA. Cuando se reemplaza uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hARSA con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hARSA, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos. Cuando

se adiciona uno o más aminoácidos a hARSA, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de hARSA, y el número de aminoácidos a adicionarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación del aminoácido. La secuencia de aminoácidos de cada una de estas hARSA mutadas tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, y aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la hARSA original.

[0167] Los ejemplos específicos de la proteína de fusión, donde la proteína diferente (A) es PPT-1 humana (hPPT-1), incluyen;

(1) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hPPT-1, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 172, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hPPT-1, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 188, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO:

180, y

(3) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hPPT-1, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 210, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0168] En cualquiera de (1) a (3) arriba citados, hPPT-1 y la cadena pesada de hTfR pueden enlazarse por un enlace peptídico, ya sea directamente o mediante una secuencia enlazadora. En particular, en cualquiera de (1) a (3) arriba citados, el significado de la frase "mediante un enlace peptídico" y el de la frase "directamente o mediante una secuencia enlazadora" son los mismos. La secuencia enlazadora empleada aquí consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos del enlazador, de preferencia se produce de glicina y serina: por ejemplo, un solo aminoácido, ya sea glicina o serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5), o una secuencia que consiste en 1 a 50 o 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29 o 27 aminoácidos que se componen de 1 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Por ejemplo,

una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Ser puede utilizarse de preferencia como secuencia enlazadora. Más aún, de preferencia se utiliza una secuencia enlazadora que comprende 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0169] Modalidades más específicas de anticuerpo humanizado más hPPT-1 incluyen la que se compone de la parte que consiste en hPPT-1 enlazada, mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser, al lado C terminal de la cadena pesada de hTfR, y la otra parte que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 263, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0170] Por otro lado, en la presente invención, si bien el término "PPT-1 humana" o "hPPT-1" se refiere en particular a la hPPT-1 que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la hPPT-1 de tipo natural, definida como SEQ ID NO: 262, también incluye aquellas secuencias de aminoácidos producidas al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición y similares, en la secuencia de aminoácidos de la hPPT-1 de tipo natural, en la medida en que tengan la actividad de PPT-1. Cuando se reemplaza uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hPPT-1 con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más

aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hPPT-1, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a hPPT-1, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de hPPT-1, y el número de aminoácidos a adicionarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación del aminoácido. La secuencia de aminoácidos de cada una de estas hPPT-1 mutadas tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, y aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la hPPT-1 original.

[0171] Los ejemplos específicos de la proteína de fusión, donde la proteína diferente (A) es PPT-1 humana (hPPT-1), incluyen;

(1) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma mediante un enlace peptídico, a hTPP-1, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 172, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena

pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma mediante un enlace peptídico, a hTPP-1, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 188, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 180, y

(3) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma mediante un enlace peptídico, a hTPP-1, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 210, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0172] En cualquiera de (1) a (3) arriba citados, hTPP-1 y la cadena pesada de hTfR pueden enlazarse por un enlace peptídico, ya sea directamente o mediante una secuencia enlazadora. En particular, en cualquiera de (1) a (3) arriba citados, el significado de la frase "mediante un enlace peptídico" y el de la frase "directamente o mediante una secuencia enlazadora" son los mismos. La secuencia enlazadora empleada aquí consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos del enlazador, de preferencia se produce de glicina y serina: por ejemplo, un solo aminoácido, ya sea glicina o serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser

(SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5), o una secuencia que consiste en 1 a 50 o 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29 o 27 aminoácidos que se componen de 1 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Ser puede utilizarse de preferencia como secuencia enlazadora. Más aún, de preferencia se utiliza una secuencia enlazadora que comprende 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0173] Modalidades más específicas de anticuerpo humanizado más hTPP-1 incluyen la que se compone de la parte que consiste en hTPP-1 enlazada, mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser, al lado C terminal de la cadena pesada de hTfR, y la otra parte que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 266, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0174] Por otro lado, en la presente invención, si bien el término "TPP-1 humana" o "hTPP-1" se refiere en particular a la hTPP-1 que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la hTPP-1 de tipo natural, definida como SEQ ID NO: 265, también incluye aquellas secuencias de aminoácidos producidas al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición y similares, en la secuencia de aminoácidos de la hTPP-1 de tipo natural, en la medida en que tengan la

actividad de TPP-1. Cuando se reemplaza uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hTPP-1 con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hTPP-1, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a hTPP-1, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de hTPP-1, y el número de aminoácidos a adicionarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación del aminoácido. La secuencia de aminoácidos de cada una de estas hTPP-1 mutadas tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, y aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la hTPP-1 original.

[0175] Los ejemplos específicos de la proteína de fusión, donde la proteína diferente (A) es α-L-iduronidasa humana (hIDUA), incluyen;

(1) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hIDUA, y la otra porción que consiste en la

cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 172, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hIDUA, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 188, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 180, y

(3) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hIDUA, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 210, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0176] En cualquiera de (1) a (3) arriba citados, hIDUA y la cadena pesada de hTfR pueden enlazarse por un enlace peptídico, ya sea directamente o mediante una secuencia enlazadora. En particular, en cualquiera de (1) a (3) arriba citados, el significado de la frase "mediante un enlace peptídico" y el de la frase "directamente o mediante una secuencia enlazadora" son los mismos. La secuencia enlazadora empleada aquí consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de

aminoácidos del enlazador, de preferencia se produce de glicina y serina: por ejemplo, un solo aminoácido, ya sea glicina o serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5), o una secuencia que consiste en 1 a 50 o 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29 o 27 aminoácidos que se componen de 1 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Ser puede utilizarse de preferencia como secuencia enlazadora. Más aún, de preferencia se utiliza una secuencia enlazadora que comprende 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0177] Modalidades más específicas de anticuerpo humanizado más hIDUA incluyen la que se compone de la parte que consiste en hIDUA enlazada, mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser, al lado C terminal de la cadena pesada de hTfR, y la otra parte que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 269, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0178] En la presente invención, si bien el término “IDUA humana” o “hIDUA” se refiere en particular a la hIDUA que tiene la misma

secuencia de aminoácidos que la hIDUA de tipo natural, definida como SEQ ID NO: 268, también incluye aquellas secuencias de aminoácidos producidas al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición y similares, en la secuencia de aminoácidos de la hIDUA de tipo natural, en la medida en que tengan la actividad de IDUA. Cuando se reemplaza uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hIDUA con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hIDUA, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a hIDUA, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de hIDUA, y el número de aminoácidos a adicionarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación del aminoácido. La secuencia de aminoácidos de la hIDUA mutada tiene una homología de preferencia de no menos de 80%, de más preferencia no menos de 90%, aún de más preferencia no menos de 95% con la secuencia de aminoácidos de la hIDUA original.

[0179] Los ejemplos específicos de la proteína de fusión, donde la

proteína diferente (A) es receptor de TNF-α humano (hTNFαR), incluyen;

[0180] (1) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hTNFαR, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 172, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hTNFαR, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 188, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 180, y

(3) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hTNFαR, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 210, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0181] En cualquiera de (1) a (3) arriba citados, hTNFαR y la cadena pesada de hTfR pueden enlazarse por un enlace peptídico, ya sea directamente o mediante una secuencia enlazadora. En particular, en

cualquiera de (1) a (3) arriba citados, el significado de la frase “mediante un enlace peptídico” y el de la frase “directamente o mediante una secuencia enlazadora” son los mismos. La secuencia enlazadora empleada aquí consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos del enlazador, de preferencia se produce de glicina y serina: por ejemplo, un solo aminoácido, ya sea glicina o serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5), o una secuencia que consiste en 1 a 50 o 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29 o 27 aminoácidos que se componen de 1 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Ser puede utilizarse de preferencia como secuencia enlazadora. Más aún, de preferencia se utiliza una secuencia enlazadora que comprende 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0182] Modalidades más específicas de anticuerpo humanizado más hTNFαR incluyen la que se compone de la parte que consiste en hTNFαR enlazado, mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser, al lado C terminal de la cadena pesada de hTfR, y la otra parte que consiste en la

cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 272, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0183] Por otro lado, en la presente invención, si bien el término "TNFαR humano" o "hTNFαR" se refiere en particular al hTNFαR que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el hTNFαR de tipo natural, definida como SEQ ID NO: 271, también incluye aquellas secuencias de aminoácidos producidas al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición y similares, en la secuencia de aminoácidos del hTNFαR de tipo natural, en la medida en que tengan la actividad o función como TNFαR. Cuando se reemplaza uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hTNFαR con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hTNFαR, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos. Cuando se adiciona uno o más aminoácidos a hTNFαR, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de hTNFαR, y el número de aminoácidos a adicionarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta adición, sustitución

y eliminación del aminoácido. La secuencia de aminoácidos de cada uno de estos hTNFαR mutados tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, y aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos del hTNFαR original.

[0184] Los ejemplos específicos de la proteína de fusión, donde la proteína diferente (A) es heparán N-sulfatasa humana (hSGSH), incluyen:

(1) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hSGSH, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 172, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hSGSH, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 188, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 180, y

(3) la que se compone de: la porción que consiste en la cadena pesada de hTfR enlazada, en el lado C terminal de la misma y mediante un enlace peptídico, a hSGSH, y la otra porción que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la

cadena pesada de hTfR de la primera se define como SEQ ID NO: 210, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0185] En cualquiera de (1) a (3) arriba citados, hSGSH y la cadena pesada de hTfR pueden enlazarse por un enlace peptídico, ya sea directamente o mediante una secuencia enlazadora. En particular, en cualquiera de (1) a (3) arriba citados, el significado de la frase "mediante un enlace peptídico" y el de la frase "directamente o mediante una secuencia enlazadora" son los mismos. La secuencia enlazadora empleada aquí consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos. Si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos del enlazador, de preferencia se produce de glicina y serina: por ejemplo, un solo aminoácido, ya sea glicina o serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 5), o una secuencia que consiste en 1 a 50 o 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29 o 27 aminoácidos que se componen de 1 a 10 o 2 a 5 de cualquiera de esas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Ser puede utilizarse de preferencia como secuencia enlazadora. Más aún, de preferencia se utiliza una secuencia enlazadora que comprende 27 aminoácidos que se compone de la secuencia de aminoácidos Gly-Ser seguida por cinco copias enlazadas

consecutivamente de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3).

[0186] Modalidades más específicas de anticuerpo humanizado más hSGSH incluyen la que se compone de la parte que consiste en hSGSH enlazada, mediante la secuencia enlazadora Gly-Ser, al lado C terminal de la cadena pesada de hTfR, y la otra parte que consiste en la cadena ligera de hTfR, en donde la secuencia de aminoácidos de la primera se define como SEQ ID NO: 275, y la secuencia de aminoácidos de la última se define como SEQ ID NO: 196.

[0187] Por otro lado, en la presente invención, si bien el término "SGSH humana" o "hSGSH" se refiere en particular a la hSGSH que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la hSGSH de tipo natural, definida como SEQ ID NO: 274, también incluye aquellas secuencias de aminoácidos producidas al introducir una mutación, tal como una sustitución, eliminación, adición y similares, en la secuencia de aminoácidos de la hSGSH de tipo natural, en la medida en que tengan la actividad de SGSH. Cuando se reemplaza uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hSGSH con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a reemplazarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. Cuando se elimina uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de hSGSH, el número de aminoácidos a eliminarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, e incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta sustitución y eliminación de aminoácidos. Cuando

se adiciona uno o más aminoácidos a hSGSH, pueden adicionarse dentro, en el lado N terminal o en el lado C terminal de la secuencia de aminoácidos de hSGSH, y el número de aminoácidos a adicionarse de preferencia es de 1 a 10, de más preferencia 1 a 5, aún de más preferencia 1 a 3, incluso de más preferencia 1 o 2. También es posible introducir una mutación combinada de esta adición, sustitución y eliminación del aminoácido. La secuencia de aminoácidos de cada una de estas hSGSH mutadas tiene una homología de preferencia no menor a 80%, de más preferencia no menor a 90%, y aún de más preferencia no menor a 95% con la secuencia de aminoácidos de la hSGSH original.

[0188] En el caso donde la proteína diferente (A), fusionada con el anticuerpo anti-hTfR, es iduronato 2-sulfatasa humana (hI2S), eritropoyetina humana (hEPO), arilsulfatasa A humana (hARSA), PPT-1 humana (hPPT-1), TPP-1 humana (hTPP-1), α-L-iduronidasa humana (hIDUA), receptor de TNF-α humano (hTNFαR), o heparán N-sulfatasa humana (hSGSH), la expresión de la proteína diferente (A), fusionada con el anticuerpo anti-hTfR, retiene la actividad o función que la proteína diferente (A) exhibe bajo una condición fisiológica, (o simplemente, retiene la actividad o función), significa que no menos de 3% de la actividad o función se retiene en comparación con la actividad o función que las proteínas de tipo natural correspondientes tienen de manera intrínseca. Sin embargo, su actividad o función de preferencia no es menor a 10%, de más preferencia no menor a 20%, aún de más preferencia no menor a 50%, e incluso de más preferencia no menor a 80%, en comparación con la actividad o función que la proteína

diferente (A) de tipo natural correspondiente tiene de manera intrínseca. Lo mismo se aplica en casos donde la proteína diferente (A), fusionada con el anticuerpo anti-hTfR, está mutada.

[0189] El anticuerpo anti-hTfR, de acuerdo con la presente invención, puede utilizarse para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central, al unirlo a la molécula de una proteína fisiológicamente activa o un compuesto de bajo peso molecular farmacológicamente activo. Y el anticuerpo anti-hTfR, conjugado con la molécula de una proteína fisiológicamente activa o un compuesto de bajo peso molecular farmacológicamente activo, puede utilizarse en el método de tratamiento de un paciente con una condición patológica del sistema nervioso central, en el cual una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína fisiológicamente activa o compuesto de bajo peso molecular farmacológicamente activo se administra al paciente con una enfermedad del sistema nervioso central por vía parenteral (incluyendo la inyección intravenosa, tal como la infusión intravenosa). El anticuerpo anti-hTfR, conjugado con la molécula de una proteína fisiológicamente activa o un compuesto de bajo peso molecular farmacológicamente activo, después de administrarse por vía parenteral, no sólo puede acceder al cerebro, sino también alcanzar otros órganos donde el hTfR se expresa.

[0190] En particular, dado que el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, como un conjugado con iduronato 2-sulfatasa humana (hI2S), puede permitir a la hI2S pasar a través de la barrera hematoencefálica y funcionar en el cerebro, el anticuerpo puede

utilizarse para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña al síndrome de Hunter. Más aún, el anticuerpo anti-hTfR conjugado con hI2S puede utilizarse en el método de tratamiento de un paciente con una condición patológica del sistema nervioso central, trastorno que acompaña al síndrome de Hunter, en el cual una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo se administra al paciente con síndrome de Hunter por vía parenteral (incluyendo la inyección intravenosa, tal como la infusión intravenosa). El anticuerpo anti-hTfR, conjugado con hI2S, después de administrarse por vía parenteral, no sólo puede acceder al cerebro, sino también alcanzar otros órganos donde el hTfR se expresa.

[0191] Más aún, dado que el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, como un conjugado con eritropoyetina humana (hEPO), puede permitir a la hEPO pasar a través de la barrera hematoencefálica y funcionar en el cerebro, el anticuerpo puede utilizarse para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la isquemia cerebral. Más aún, el anticuerpo anti-hTfR conjugado con hEPO puede utilizarse en el método de tratamiento de un paciente con una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la isquemia cerebral, en el cual una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo conjugado se administra al paciente con isquemia cerebral por vía parenteral (incluyendo la inyección intravenosa, tal como la infusión intravenosa). El anticuerpo anti-hTfR, conjugado con hEPO, después de

administrarse por vía parenteral, no sólo puede acceder al cerebro, sino también alcanzar otros órganos donde el hTfR se expresa. Lo mismo se aplica si la eritropoyetina humana se reemplaza con darbepoyetina humana.

[0192] Más aún, dado que el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, como un conjugado con arilsulfatasa A humana (hARSA), puede permitir a la hARSA pasar a través de la barrera hematoencefálica y funcionar en el cerebro, el anticuerpo puede utilizarse para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la degeneración de materia blanca metacromática (leucodistrofia metacromática). Más aún, el anticuerpo anti-hTfR conjugado con hARSA puede utilizarse en el método de tratamiento de un paciente con una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la degeneración de materia blanca metacromática (leucodistrofia metacromática), en el cual una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo conjugado se administra al paciente con la enfermedad por vía parenteral (incluyendo la inyección intravenosa, tal como la infusión intravenosa). El anticuerpo anti-hTfR, conjugado con hARSA, después de administrarse por vía parenteral, no sólo puede acceder al cerebro, sino también alcanzar otros órganos donde el hTfR se expresa.

[0193] Más aún, dado que el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, como un conjugado con PPT-1 humana (hPPT-1), puede permitir a la hPPT-1 pasar a través de la barrera hematoencefálica y funcionar en el cerebro, el anticuerpo puede utilizarse para la

producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la lipofuscinosis ceroidea neuronal o enfermedad de Santavuori-Haltia. Más aún, el anticuerpo anti-hTfR conjugado con hPPT-1 puede utilizarse en el método de tratamiento de un paciente con una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la lipofuscinosis ceroidea neuronal o enfermedad de Santavuori-Haltia, en el cual una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo conjugado se administra al paciente con cualquiera de estas enfermedades por vía parenteral (incluyendo la inyección intravenosa, tal como la infusión intravenosa). El anticuerpo anti-hTfR, conjugado con hPPT-1, después de administrarse por vía parenteral, no sólo puede acceder al cerebro, sino también alcanzar otros órganos donde el hTfR se expresa.

[0194] Más aún, dado que el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, como un conjugado con TPP-1 humana (hTPP-1), puede permitir a la hTPP-1 pasar a través de la barrera hematoencefálica y funcionar en el cerebro, el anticuerpo puede utilizarse para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la lipofuscinosis ceroidea neuronal o enfermedad de Jansky-Bielschowsky. Más aún, el anticuerpo anti-hTfR conjugado con hPPT-1 puede utilizarse en el método de tratamiento de un paciente con una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la lipofuscinosis ceroidea neuronal o enfermedad de Jansky-Bielschowsky, en el cual una cantidad

terapéuticamente efectiva del anticuerpo conjugado se administra al paciente con cualquiera de estas enfermedades por vía parenteral (incluyendo la inyección intravenosa, tal como la infusión intravenosa). El anticuerpo anti-hTfR, conjugado con hTPP-1, después de administrarse por vía parenteral, no sólo puede acceder al cerebro, sino también alcanzar otros órganos donde el hTfR se expresa.

[0195] Más aún, dado que el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, como un conjugado con α-L-iduronidasa humana (hIDUA), puede permitir a la hIDUA pasar a través de la barrera hematoencefálica y funcionar en el cerebro, el anticuerpo puede utilizarse para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña al síndrome de Hurler o síndrome de Hurler-Scheie. Más aún, el anticuerpo anti-hTfR conjugado con hIDUA puede utilizarse en el método de tratamiento de un paciente con una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña al síndrome de Hurler o síndrome de Hurler-Scheie, en el cual una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo conjugado se administra al paciente con cualquiera de estas enfermedades por vía parenteral (incluyendo la inyección intravenosa, tal como la infusión intravenosa). El anticuerpo anti-hTfR, conjugado con hIDUA, después de administrarse por vía parenteral, no sólo puede acceder al cerebro, sino también alcanzar otros órganos donde el hTfR se expresa.

[0196] Más aún, dado que el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, como un conjugado con receptor de TNF-α humano (hTNFαR), puede permitir al hTNFαR pasar a través de la barrera

hematoencefálica y funcionar en el cerebro, el anticuerpo puede utilizarse para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la isquemia cerebral o encefalitis. Más aún, el anticuerpo anti-hTfR conjugado con hTNFαR puede utilizarse en el método de tratamiento de un paciente con una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña a la isquemia cerebral o encefalitis, en el cual una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo conjugado se administra al paciente con cualquiera de estas enfermedades por vía parenteral (incluyendo la inyección intravenosa, tal como la infusión intravenosa). El anticuerpo anti-hTfR, conjugado con hTNFαR, después de administrarse por vía parenteral, no sólo puede acceder al cerebro, sino también alcanzar otros órganos donde el hTfR se expresa.

[0197] Más aún, dado que el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, como un conjugado con heparán N-sulfatasa humana (hSGSH), puede permitir a la hSGSH pasar a través de la barrera hematoencefálica y funcionar en el cerebro, el anticuerpo puede utilizarse para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña al síndrome de Sanfilippo. Más aún, el anticuerpo anti-hTfR conjugado con hSGSH puede utilizarse en el método de tratamiento de un paciente con una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña al síndrome de Sanfilippo, en el cual una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo conjugado se administra al paciente con

cualquiera de estas enfermedades por vía parenteral (incluyendo la inyección intravenosa, tal como la infusión intravenosa). El anticuerpo anti-hTfR, conjugado con hSGSH, después de administrarse por vía parenteral, no sólo puede acceder al cerebro, sino también alcanzar otros órganos donde el hTfR se expresa.

[0198] Las proteínas, compuesto de bajo peso molecular y similares, que se conjugan con el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, pueden utilizarse como agentes farmacéuticos que deben exhibir sus funciones en el sistema nervioso central (CNS) después de administrarse por vía parenteral. Estos agentes farmacéuticos pueden administrarse a los pacientes por lo general por inyección intravenosa, tales como inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular y similares, si bien no hay limitación particular en lo que se refiere a la ruta de su administración.

[0199] Las proteínas, los compuestos de bajo peso molecular y similares, que se conjugan con el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, pueden proporcionarse a instalaciones médicas como agentes farmacéuticos en una forma tal como un producto liofilizado o una preparación acuosa. En el caso de una preparación acuosa, puede proporcionarse en forma de preparaciones en las cuales uno de los agentes farmacéuticos se disuelve en una solución que contiene un estabilizante, regulador y un agente isotónico de antemano, y se sella en viales o jeringas. Un tipo de preparaciones selladas en una jeringa por lo general se denomina preparación de tipo jeringa llenada previamente. Al adoptar la forma de una preparación de tipo jeringa llenada previamente facilita la autoadministración de los pacientes del agente

farmacéutico.

[0200] En casos donde se proporciona una preparación acuosa, la concentración de la proteína, el compuesto de bajo peso molecular o similares, conjugados con el anticuerpo anti-hTfR en la preparación acuosa, por ejemplo, es de 1 a 4 mg/ml, si bien debe ajustarse según se desee en concordancia con la dosificación. En casos donde no hay limitación particular en lo que se refiere a los estabilizantes a contenerse en la preparación acuosa, en la medida en que se encuentren farmacéuticamente disponibles, de preferencia pueden utilizarse surfactantes no iónicos. Los ejemplos de estos surfactantes no iónicos incluyen polisorbato y poloxámero, cualquiera de los cuales puede utilizarse solo o en combinación. Entre los polisorbatos, el polisorbato 20 y polisorbato 80 se utilizan de preferencia. Como poloxámero, el poloxámero 188 (polioxietilen (160) polioxipropilen (30) glicol) se prefiere particularmente. Más aún, la concentración del surfactante no iónico, contenido en la preparación acuosa, de preferencia es de 0.01 a 1 mg/ml, de más preferencia, 0.01 a 0.5 mg/ml, y aún de más preferencia 0.1 a 0.5 mg/ml. Como estabilizantes, los aminoácidos tales como histidina, arginina, metionina y glicina también pueden utilizarse. En casos donde se emplea como estabilizante, la concentración de un aminoácido en la preparación acuosa de preferencia es de 0.1 a 40 mg/ml, de más preferencia 0.2 a 5 mg/ml, y aún de más preferencia 0.5 a 4 mg/ml. Aunque no hay limitación particular en lo que se refiere a un regulador a contenerse en la preparación acuosa, en la medida en que se encuentre farmacéuticamente disponible, se prefiere regulador de fosfatos, y se prefiere más el regulador de fosfato de sodio. En casos

donde se utiliza como regulador, la concentración del fosfato de sodio de preferencia es de 0.01 a 0.04 M. El pH de la preparación acuosa, ajustado con un regulador, de preferencia es de 5.5 a 7.2. Mientras no hay limitación particular en lo que se refiere a un agente isotónico a contenerse en la preparación acuosa, en la medida en que se encuentre farmacéuticamente disponible, el cloruro de sodio o manitol pueden utilizarse de preferencia, solos o en combinación como agente isotónico.

Ejemplos

[0201] Si bien la presente invención se describe con mayor profundidad a continuación con referencia a los ejemplos, no se tiene la intención de que la presente invención se limite a esos ejemplos.

[0202] Ejemplo 1 Construcción de vector de expresión de hTfR

Al emplear el Quick Clone cDNA de bazo humano (Clontech Inc.) como plantilla y al utilizar el iniciador hTfR5' (SEQ ID NO: 214) e iniciador hTfR3' (SEQ ID NO: 215), se realizó PCR para amplificar el fragmento génico que codifica el receptor de transferrina humana (hTfR). El fragmento amplificado que codificaba hTfR se digirió con MluI y NotI, y luego se insertó entre los sitios MluI y NotI del vector pCI-neo (Promega Corp.). El vector preparado de este modo se designó pCI-neo(hTfR). Este vector luego se digirió con MluI y NotI para cortar el fragmento génico que codificaba hTfR, y este fragmento se insertó entre los sitios MluI y NotI de pE-mIRES-GS-puro, un vector de expresión dado a conocer en la publicación internacional WO 2012/063799 para construir un vector de expresión de hTfR, pE-mIRES-GS-puro(hTfR).

[0203] Ejemplo 2 Preparación de hTfR recombinante

En células CHO-K1 se introdujo pE-mIRES-GS-puro(hTfR) por electroporación, y las células luego se sometieron a cultivo de selección en un medio CD OptiCHO™ (Invitrogen Inc.), el cual contiene metionina sulfoximina (MSX) y puromicina para preparar células con expresión de hTfR recombinante. Las células con expresión de hTfR recombinante se cultivaron y se preparó hTfR recombinante.

[0204] Ejemplo 3 Inmunización de ratones con hTfR recombinante

Se inmunizaron ratones con hTfR recombinante preparado en el Ejemplo 2 como antígeno. La inmunización se llevó a cabo al inyectar por vía intravenosa o intraperitoneal a los ratones con el antígeno.

[0205] Ejemplo 4 Preparación de células de hibridoma

Alrededor de una semana después de la última inyección, los bazos de los ratones se extirparon y homogenizaron para aislar los esplenocitos. Los esplenocitos obtenidos de este modo se fusionaron con células de una línea celular de mieloma de ratón (P3.X63.Ag8.653) por el método de polietilenglicol. Después de la fusión celular, las células se suspendieron en un medio RPMI 1640 que contenía (1X) HAT Supplement (Life Technologies Inc.) y 10% de suero bovino fetal Ultra low IgG (Life Technologies Inc.), y la suspensión celular se distribuyó en veinte placas de 96 pozos, cada una a 200 µl/pozo. Después, las células se cultivaron por 10 días en una incubadora de dióxido de carbono (37 °C, 5% de CO_2), cada pozo se examinó bajo un microscopio, y se seleccionaron los pozos que contenían una sola colonia.

[0206] Cuando las células en cada pozo alcanzaron la confluencia cercana, el sobrenadante de cultivo se recolectó como sobrenadante de

cultivo de hibridoma, y se sometió al siguiente proceso de análisis selectivo.

[0207] Ejemplo 5 Análisis selectivo de una línea celular productora de anticuerpos de alta afinidad

La solución de hTfR recombinante (Sino Biologics Inc.) se diluyó con regulador de fosfato de sodio 50 mM (pH 9.5 a 9.6) a 5 μg/ml para preparar una solución en fase sólida. Después de que 50 μl de la solución en fase sólida se adicionaron a cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano Nunc MaxiSorp™ (sustrato: poliestireno, mfd. por Nunc Inc.), la placa se dejó reposar por una hora a temperatura ambiente para dejar al hTfR recombinante adherirse a la placa e inmovilizarse. La solución en fase sólida se descartó, cada pozo se lavó tres veces con 250 μl de solución de lavado (PBS que contenía 0.05% de Tween20), 200 μl de una solución de bloqueo (PBS que contenía 1% de BSA) luego se adicionaron a cada pozo, y la placa se dejó reposar por una hora a temperatura ambiente.

[0208] La solución de bloqueo se descartó, y cada pozo se lavó tres veces con 250 μl de solución de lavado (PBS que contenía 0.05% de Tween20). A cada pozo se adicionaron 50 μl del sobrenadante de cultivo de hibridoma, y la placa se dejó reposar por una hora a temperatura ambiente para dejar al anticuerpo anti-hTfR de ratón, contenido en el sobrenadante de cultivo, unirse al hTfR recombinante. Al mismo tiempo, a algunos pozos se adicionaron 50 μl de sobrenadante de cultivo de un hibridoma que no producía anticuerpo anti-hTfR de ratón, como control. Además, 50 μl del medio para cultivo de hibridoma se adicionaron a los pozos, como pozos simulados, al lado de

los pozos a los cuales se adicionó el sobrenadante de cultivo. La medición se condujo en forma n = 2. Luego, la solución se descartó, y cada pozo se lavó tres veces con 250 µl de solución de lavado (PBS que contenía 0.05% de Tween20).

[0209] A cada uno de los pozos anteriores se adicionaron 100 µl de solución de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulina de ratón etiquetados con HRP (Promega Inc.), y la placa se dejó reposar por un minuto a temperatura ambiente. La solución luego se descartó, y cada pozo se lavó tres veces con 250 µl de solución de lavado (PBS que contenía 0.05% de Tween20). A cada pozo se adicionaron 50 µl de una solución de sustrato cromogénico, TMB Stabilized Substrate For Horseradish Peroxidase (Promega Inc.), y los pozos se dejaron reposar por 10 a 20 minutos a temperatura ambiente. Entonces, después de la adición de 100 µl de una solución de detención (ácido sulfúrico 2 N), la absorbancia de cada pozo se midió en un lector de placas a 450 nm. De los dos pozos para cada uno del sobrenadante de cultivo y control, se tomaron los valores medios, respectivamente, y de cada uno de los valores medios, el valor medio respectivo para los dos pozos simulados, colocados correspondientes a cada uno del sobrenadante de cultivo y el control, se restó ofreciendo la medición.

[0210] Catorce tipos de células de hibridoma, correspondientes a los sobrenadantes de cultivos adicionados a los pozos que exhibieron las mediciones más altas, se seleccionaron como las líneas celulares (línea celular productora de anticuerpos de alta afinidad) que producen anticuerpos que exhiben altas afinidades por hTfR (anticuerpo anti-hTfR de alta afinidad). Estos catorce tipos de líneas celulares se

designaron como línea de Clon 1 a línea de Clon 14. Más aún, los anticuerpos anti-hTfR producidos por la línea de Clon 1 a la línea de Clon 14 se designaron como los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 14, respectivamente.

[0211] Ejemplo 6 Análisis de la secuencia de aminoácidos de región variable de los anticuerpos anti-hTfR de alta afinidad

A partir de cada una de la línea de Clon 1 a la línea de Clon 14, seleccionadas en el Ejemplo 5, se prepararon cDNA al utilizar como plantilla los genes que codifican la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo y se amplificaron. Al traducir la secuencia de nucleótidos de los genes amplificados, las respectivas secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada se determinaron para los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 14 producidos por las líneas celulares.

[0212] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 1 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 218 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 219 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 o 7 como CDR1; la SEQ ID NO: 8 o 9 como CDR2, y la SEQ ID NO: 10 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 o 77 como CDR1, la SEQ ID NO: 78 o 79 como CDR2, y la SEQ ID NO: 80 o 81 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de

secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0213] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 2 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 220 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 221 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 o 12 como CDR1; la SEQ ID NO: 13 o 14 como CDR2, y la SEQ ID NO: 15 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 o 83 como CDR1, la SEQ ID NO: 84 o 85 como CDR2, y la SEQ ID NO: 86 o 87 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0214] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 3 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 222 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 223 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 o 17 como CDR1; la SEQ

ID NO: 18 o 19 como CDR2, y la SEQ ID NO: 20 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 o 89 como CDR1, la SEQ ID NO: 90 o 91 como CDR2, y la SEQ ID NO: 92 o 93 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0215] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 4 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 224 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 225 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 o 22 como CDR1; la SEQ ID NO: 23 o 24 como CDR2, y la SEQ ID NO: 25 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 o 95 como CDR1, la SEQ ID NO: 96 o 97 como CDR2, y la SEQ ID NO: 98 o 99 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0216] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 5 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 226 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 227 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 o 27 como CDR1; la SEQ ID NO: 28 o 29 como CDR2, y la SEQ ID NO: 30 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 o 101 como CDR1, la SEQ ID NO: 102 o 103 como CDR2, y la SEQ ID NO: 104 o 105 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0217] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 6 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 228 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 229 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 o 32 como CDR1; la SEQ ID NO: 33 o 34 como CDR2, y la SEQ ID NO: 35 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 o 107 como CDR1, la SEQ ID NO: 108 o 278 como CDR2, y la SEQ ID NO: 109 o 110 como CDR3. Sin

embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0218] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 7 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 230 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 231 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 o 37 como CDR1; la SEQ ID NO: 38 o 39 como CDR2, y la SEQ ID NO: 40 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 o 112 como CDR1, la SEQ ID NO: 113 o 114 como CDR2, y la SEQ ID NO: 115 o 116 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0219] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 8 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 232 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 233 como la región variable de cadena pesada. Se

encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 o 42 como CDR1; la SEQ ID NO: 43 o 44 como CDR2, y la SEQ ID NO: 45 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 o 118 como CDR1, la SEQ ID NO: 119 o 279 como CDR2, y la SEQ ID NO: 120 o 121 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0220] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 9 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 234 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 235 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 o 47 como CDR1; la SEQ ID NO: 48 o 49 como CDR2, y la SEQ ID NO: 50 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 o 123 como CDR1, la SEQ ID NO: 124 o 125 como CDR2, y la SEQ ID NO: 126 o 127 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no

menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0221] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 10 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 236 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 237 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 o 52 como CDR1; la SEQ ID NO: 53 o 54 como CDR2, y la SEQ ID NO: 55 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 o 129 como CDR1, la SEQ ID NO: 130 o 131 como CDR2, y la SEQ ID NO: 132 o 133 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0222] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 11 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 238 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 239 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 o 57 como CDR1; la SEQ ID NO: 58 o 59 como CDR2, y la SEQ ID NO: 60 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos

definida como SEQ ID NO: 134 o 135 como CDR1, la SEQ ID NO: 136 o 137 como CDR2, y la SEQ ID NO: 138 o 139 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0223] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 12 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 240 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 241 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 o 62 como CDR1; la SEQ ID NO: 63 o 64 como CDR2, y la SEQ ID NO: 65 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 o 141 como CDR1, la SEQ ID NO: 142 o 143 como CDR2, y la SEQ ID NO: 144 o 145 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0224] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 13 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 242 como la

región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 243 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 o 67 como CDR1; la SEQ ID NO: 68 o 69 como CDR2, y la SEQ ID NO: 70 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 o 147 como CDR1, la SEQ ID NO: 148 o 149 como CDR2, y la SEQ ID NO: 150 o 151 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0225] Se encontró que el anticuerpo anti-hTfR No. 14 incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 244 como la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 245 como la región variable de cadena pesada. Se encontró que la región variable de cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 o 72 como CDR1; la SEQ ID NO: 73 o 74 como CDR2, y la SEQ ID NO: 75 como CDR3; y que la región variable de cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 o 153 como CDR1, la SEQ ID NO: 154 o 155 como CDR2, y la SEQ ID NO: 156 o 157 como CDR3. Sin embargo, también se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, sino también pueden ser

regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0226] La Tabla 1 muestra colectivamente las SEQ ID NOs de las respectivas secuencias de aminoácidos incluidas en las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 14.

[0227] Tabla 1

Anticuerpo No.	región variable de cadena ligera	región variable de cadena pesada
1	218	219
2	220	221
3	222	223
4	224	225
5	226	227
6	228	229
7	230	231
8	232	233
9	234	235
10	236	237
11	238	239
12	240	241
13	242	243
14	244	245

[0228] La Tabla 2 muestra colectivamente las SEQ ID NOs de las respectivas secuencias de aminoácidos contenidas en CDR1 a CDR3 de la región variable de cadena ligera, y CDR1 a CDR3 de la región variable de cadena pesada de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 14.

Sin embargo, la Tabla 2 muestra esas secuencias de aminoácidos sólo como ejemplos y no limita la secuencia de aminoácidos de cada CDR a aquellas en la Tabla 2, sino se consideró que las CDR no se limitan a las que consisten en estas secuencias de aminoácidos, pero también pueden ser regiones de secuencias de aminoácidos que incluyen cualquiera de las secuencias anteriores, o secuencias de aminoácidos que consisten en no menos de tres aminoácidos consecutivos que contienen parte de las secuencias anteriores.

[0229] Tabla 2

Anticuerpo No.	región variable de cadena ligera			región variable de cadena pesada		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
1	6, 7	8, 9	10	76, 77	78, 79	80, 81
2	11, 12	13, 14	15	82, 83	84, 85	86, 87
3	16, 17	18, 19	20	88, 89	90, 91	92, 93
4	21, 22	23, 24	25	94, 95	96, 97	98, 99
5	26, 27	28, 29	30	100, 101	102, 103	104, 105
6	31, 32	33, 34	35	106, 107	108, 278	109, 110
7	36, 37	38, 29	40	111, 112	113, 114	115, 116
8	41, 42	43, 44	45	117, 118	119, 279	120, 121
9	46, 47	48, 49	50	122, 123	124, 125	126, 127
10	51, 52	53, 54	55	128, 129	130, 131	132, 133
11	56, 57	58, 59	60	134, 135	136, 137	138, 139
12	61, 62	63, 64	65	140, 141	142, 143	144, 145
13	66, 67	68, 69	70	146, 147	148, 149	150, 151
14	71, 72	73, 74	75	152, 153	154, 155	156, 157

[0230] Ejemplo 7 Medición de la afinidad del anticuerpo anti-hTfR por los TfR humano y de mono

La afinidad del anticuerpo anti-hTfR por los TfR humano y de

mono se midió en Octet RED96 (ForteBio Inc., subsidiaria de Pall Corporation), un sistema para el análisis de interacciones entre biomoléculas al utilizar interferometría de biocapas (BLI). Los principios básicos de la interferometría de biocapas se explican brevemente a continuación. Cuando una capa de una biomolécula inmovilizada en la superficie de una punta de sensor se irradia con luz de cierta longitud de onda, la luz se refleja desde dos de las superficies, la de la biomolécula y la otra de la capa de referencia interna, lo que produce ondas de luz interferente. Una molécula en la muestra que se mide se une a la biomolécula en la superficie de la punta de sensor y, de este modo, incrementa el grosor de las capas en la punta de sensor, lo cual resulta en un desplazamiento entre las ondas interferentes. Al medir las variaciones de este desplazamiento entre las ondas interferentes, la determinación del número de las moléculas unidas a la capa de las biomoléculas inmovilizadas a la superficie de la punta de sensor, y su análisis cinético, pueden realizarse en tiempo real. La medición se realizó en general de acuerdo con el manual operativo incorporado a Octet RED96. Como TfR humano, se utilizó un TfR humano recombinante (TfR humano r: Sino Biological Inc.), el cual tenía la secuencia de aminoácidos de la región extracelular de hTfR, es decir, el residuo de cisteína en la posición 89 del lado N terminal a la fenilalanina en el extremo C terminal, de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 1, con una etiqueta de histidinas incorporada al extremo N terminal. Como TfR de mono, se utilizó un TfR de mono recombinante (TfR de mono r: Sino Biological Inc.), el cual tenía la secuencia de aminoácidos de la región extracelular de TfR

de macaco cangrejero, es decir, el residuo de cisteína en la posición 89 del lado N terminal a la fenilalanina en el extremo C terminal, de la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 2, con una etiqueta de histidinas incorporada al extremo N terminal.

[0231] La línea de Clon 1 a la línea de Clon 14, seleccionadas en el Ejemplo 5, se diluyeron respectivamente con un medio RPMI 1640 que contenía (1X) HAT Supplement (Life Technologies Inc.) y 10% de suero bovino fetal Ultra low IgG (Life Technologies Inc.) con el fin de ajustar la densidad celular a aproximadamente 2 x 10^5 células/ml. A un matraz cónico de 1 l se adicionaron 200 ml de cada suspensión celular, y el cultivo se realizó por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 °C, 5% de CO_2 y 95% de aire, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm. El sobrenadante de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar el sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo, recolectado de este modo, se cargó en una columna de Proteína G (volumen de columna: 1 ml, GE Healthcare Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Después de que la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del mismo regulador, el anticuerpo adsorbido se eluyó con 4 volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM, y las fracciones eluidas se recolectaron. Las fracciones eluidas se ajustaron a pH 7.0 por la adición de regulador Tris 1 M (pH 8.0). Estas se utilizaron como productos purificados de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 14 en los experimentos descritos a continuación.

[0232] Cada uno de los anticuerpos (anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 14), arriba purificados, se sometió a etapas de dilución doble con HBS-P+ (HEPES 10 mM que contenía NaCl 150 mM, EDTA 50 μM y 0.05% de Surfactante P20) para preparar soluciones de anticuerpos de 7 concentraciones diferentes, 0.78125 a 50 nM (0.117 a 7.5 μg/ml). Estas soluciones de anticuerpos se utilizaron como las soluciones de muestras. Los TfR humano r y de mono r se diluyeron respectivamente con HBS-P+ para preparar soluciones de 25 μg/ml, las cuales se utilizaron como solución de TfR humano r-ECD (etiqueta His) y solución de TfR de mono r-ECD (etiqueta His), respectivamente.

[0233] Cada una de las soluciones de muestras, preparadas arriba por etapas de dilución doble, se adicionó, a 200 μl/pozo, a una placa de 96 pozos, negra (Greiner Bio-One Inc.). Cada una de la solución de TfR humano r-ECD (etiqueta His) y la solución de TfR de mono r-ECD (etiqueta His), preparadas arriba, se adicionó, a 200 μl/pozo, a pozos predeterminados. A los pozos respectivos para línea de referencia, disociación y lavado, se adicionaron HBS-P+, a 200 μl/pozo. A los pozos para regeneración se adicionaron Glicina-HCl 10 mM, pH 1.7, a 200 μl/pozo. A los pozos para activación se adicionó solución de $NiCl_2$ 0.5 mM, a 200 μl/pozo. La placa y biosensor (Biosensor/Ni-NTA: ForteBio Inc., una subsidiaria de Pall Corporation) se ajustaron en las posiciones recomendadas de Octet RED96.

[0234] Octet RED96 se corrió bajo las condiciones mostradas en la Tabla 3 a continuación para recolectar datos, en los cuales entonces, al utilizar el software de análisis incorporado a Octet RED96, y ajustar la curva de reacción de unión a modelo de unión 1:1 o modelo de unión

2:1, la constante cinética de asociación (k_{on}) y constante cinética de disociación (k_{off}) del anticuerpo anti-hTfR para TfR humano r y TfR de mono r se midieron, y se calculó la constante de disociación (Kd). La medición se realizó a 25 a 30 °C.

[0235] Tabla 3

	Etapa	Tiempo de contacto (s)	Velocidad (rpm)	Umbral
1	Línea de ref. 1	60	1000	-
2	Carga	600	1000	1.5-2.0
3	Línea de ref. 2	60	1000	
4	Asociación	180	1000	
5	Disociación	540	1000	
6	Regeneración	5	1000	
7	Lavado	5	1000	
Etapas 6 a 7 repetidas 6 a 7 veces				
8	Activación	60	1000	-
Etapas 1 a 8 repetidas hasta que todas las muestras se miden				

[0236] La Tabla 4 muestra los resultados de la medición de la constante cinética de asociación (k_{on}), constante cinética de disociación (k_{off}) de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 14 (correspondientes a los anticuerpos Nos. 1 a 14, respectivamente, en la Tabla), y la constante de disociación (k_D) para TfR humano.

[0237] Tabla 4

Anticuerpo No.	kon ($M^{-1}s^{-1}$)	koff (s^{-1})	K_D (M)
1	5.00×10^5	2.55×10^{-6}	5.09×10^{-12}
2	1.11×10^6	1.23×10^{-5}	1.12×10^{-11}
3	6.53×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
4	1.91×10^6	2.29×10^{-4}	1.20×10^{-10}
5	6.71×10^5	2.44×10^{-5}	3.64×10^{-11}
6	7.54×10^5	7.23×10^{-4}	9.58×10^{-10}
7	3.69×10^5	3.03×10^{-5}	8.22×10^{-11}
8	6.96×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
9	7.82×10^5	9.46×10^{-5}	1.21×10^{-10}
10	6.79×10^5	7.66×10^{-4}	1.13×10^{-9}
11	2.72×10^5	2.28×10^{-5}	8.37×10^{-11}
12	7.54×10^5	7.23×10^{-4}	4.32×10^{-10}
13	8.35×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
14	9.61×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$

[0238] La Tabla 5 muestra los resultados de la medición de la constante cinética de asociación (k_{on}), constante cinética de disociación (k_{off}) de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 14 (correspondientes a los anticuerpos Nos. 1 a 14, respectivamente, en la Tabla), y la constante de disociación (k_D) para TfR de mono.

[0239] Tabla 5

Anticuerpo No.	kon ($M^{-1}s^{-1}$)	koff (s^{-1})	K_D (M)
1	2.80×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
2	4.18×10^5	1.75×10^{-6}	4.18×10^{-11}
3	3.89×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
4	7.54×10^5	1.21×10^{-4}	1.61×10^{-10}
5	5.19×10^5	7.58×10^{-4}	1.46×10^{-9}
6	4.95×10^5	2.36×10^{-4}	1.23×10^{-10}
7	2.66×10^5	4.54×10^{-6}	1.71×10^{-11}
8	5.52×10^5	5.07×10^{-3}	9.18×10^{-9}
9	6.99×10^5	1.47×10^{-4}	2.10×10^{-9}
10	3.87×10^5	1.22×10^{-2}	3.16×10^{-8}
11	1.24×10^5	4.21×10^{-4}	3.38×10^{-9}
12	5.05×10^5	1.26×10^{-4}	2.49×10^{-10}
13	5.91×10^5	7.29×10^{-5}	1.23×10^{-10}
14	7.00×10^5	3.61×10^{-5}	5.16×10^{-11}

[0240] Como resultado de la medición de afinidad de esos anticuerpos anti-hTfR para TfR humano, la constante de disociación con TfR humano no fue de más de 1 x 10^{-8} M para la totalidad de los anticuerpos; y para 13 anticuerpos, excepto el anticuerpo No. 10, la constante de disociación con TfR humano no fue de más de 1 x 10^{-9} M; y para los anticuerpos Nos. 3, 8, 13 y 14, en particular, la constante de disociación no fue de más de 1 x 10^{-12} M (Tabla 4). El resultado demuestra que la totalidad de los 14 anticuerpos son anticuerpos que tienen un anticuerpo de alta afinidad para TfR humano. Luego, al considerar el resultado de la medición de la afinidad de los anticuerpos anti-hTfR para TfR de mono, la constante de disociación con TfR de

mono no fue de más de 5 x 10^{-8} M para la totalidad de los anticuerpos, y para los anticuerpos Nos. 1 y 3, en particular, la constante de disociación con TfR de mono no fue de más de 1 x 10^{-12} M (Tabla 5). El resultado muestra que la totalidad de los 14 anticuerpos son anticuerpos que tienen un anticuerpo de alta afinidad no sólo para TfR humano, sino también para TfR de mono.

[0241] Ejemplo 7-2 Evaluación de la captación cerebral de los anticuerpos anti-hTfR al utilizar ratones

Entonces, para 13 anticuerpos, los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 9 y 11 a 14, se realizó una evaluación acerca de su transferencia hacia el cerebro a través de la BBB, al utilizar ratones con inserción génica en hTfR (ratones hTfR-KI) en los cuales el gen que codifica la región extracelular del receptor de transferrina de ratón se ha reemplazado con un gen que codifica la región extracelular del receptor de transferrina humana. Los ratones hTfR-KI se produjeron por el método descrito a continuación en su totalidad. Por otro lado, los anticuerpos purificados del Ejemplo 7 se utilizaron como los anticuerpos anti-hTfR.

[0242] Un fragmento de DNA que tenía una secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 253 se sintetizó químicamente, en el cual un gen de resistencia a neomicina, flanqueado por secuencias loxP, se colocó en el lado 3' de un cDNA que codifica un hTfR quimérico cuya región intracelular consistía en la secuencia de aminoácidos de hTfR de ratón, y la región extracelular consistía en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de hTfR humano. Este fragmento de DNA se insertó por un método convencional en un vector de orientación que tenía, como la secuencia del brazo 5', una secuencia de nucleótidos definida

como SEQ ID NO: 254, y como la secuencia del brazo 3', una secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 255, y la construcción se introdujo en células ES de ratón por electroporación. Las células ES de ratón, a las cuales se había introducido el gen, se sometieron a cultivo de selección en un medio en presencia de neomicina, para seleccionar las células ES de ratón en las cuales el vector de orientación se había incorporado en el cromosoma a través de recombinación homóloga. Las células ES de ratón recombinantes, obtenidas de este modo, se inyectaron en embriones en fase de 8 células (embriones hospedadores) de ratones ICR, y los embriones preparados de este modo se implantaron en ratones pseudogestantes (ratones receptores) que se habían obtenido a través de apareamiento con ratones que se habían sometido a ligación de conductos. La progenie (ratones quiméricos) obtenida se examinó por su color de pelo, y se seleccionaron los ratones que tenían la proporción superior de pelos blancos en su capa corporal total, es decir, aquellos ratones en los cuales las células ES habían contribuido a las tasas superiores en el desarrollo de los organismos individuales. Cada uno de estos ratones quiméricos se apareó con ratones ICR para generar ratones F1. Los ratones F1 con pelo blanco se seleccionaron, los DNA extraídos de su tejido caudal se analizaron, y los ratones cuyo gen de receptor de transferrina de ratón en sus cromosomas se había reemplazado con hTfR quimérico, se consideraron como ratones hTfR-KI.

[0243] Los 13 anticuerpos anti-hTfR anteriores se etiquetaron en forma fluorescente por isotiocianato de fluoresceína (FITC) al utilizar el Fluorescein Labeling Kit-NH_2 (Dojindo Laboratories) de acuerdo con el

manual incorporado. Se prepararon soluciones de PBS cada una con uno de los 13 anticuerpos anti-hTfR etiquetados con fluorescencia por FITC. Cada una de estas soluciones de anticuerpos en PBS se inyectó por vía intravenosa a un ratón hTfR-KI (macho, 10 a 12 semanas de edad), a la dosificación de anticuerpos anti-hTfR de 3 mg/kg. Como control, una solución de PBS que contenía IgG1 de ratón (Sigma Inc.), etiquetada en forma fluorescente por FITC de la misma manera que antes, se inyectó por vía intravenosa a un ratón hTfR-KI (macho, 10 a 12 semanas de edad), a la dosis de 3 mg/kg. Alrededor de ocho horas después de la inyección intravenosa, el cuerpo completo se perfundió con solución salina y se obtuvo el cerebro (parte incluyendo el cerebro y el cerebelo). El cerebro extirpado de este modo se pesó (peso húmedo), y luego los tejidos cerebrales se homogeneizaron con T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Inc.). El homogenizado se centrifugó, el sobrenadante se recolectó y la cantidad del anticuerpo etiquetado con fluorescencia por FITC, contenido en el sobrenadante, se midió de la siguiente manera. Primero, 10 µl de anti-FITC Antibody (Bethyl Inc.) se adicionaron a cada pozo de una High Bind Plate (Meso Scale Diagnostics Inc.) y se dejó reposar por una hora con el fin de inmovilizarlo a la placa. Entonces, la placa se bloqueó por la adición de 150 µl de regulador SuperBlock Blocking en PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) a cada pozo y la agitación de la placa por una hora. Luego, 25 µl del sobrenadante de un homogenizado de tejido cerebral se adicionaron a cada pozo, y la placa se agitó por una hora. Entonces, 25 µl de SULFO-TAG Anti-Mouse Antibody (Goat) (Meso Scale Diagnostics

Inc.) se adicionaron a cada pozo, y la agitación se continuó por una hora. Luego, a cada pozo se adicionaron 150 µl de Read Buffer T (Meso Scale Diagnostics Inc.), y la cantidad de luminiscencia de cada pozo se leyó en un lector Sector™ Imager 6000. La cantidad del anticuerpo contenido por gramo de cerebro (peso húmedo) (la concentración del anticuerpo anti-hTfR en los tejidos cerebrales) se calculó al producir una curva estándar con base en mediciones de muestras estándar que contenían concentraciones conocidas de anticuerpo anti-hTfR etiquetado en forma fluorescente por FITC, y luego interpolar la medición de cada una de las muestras con referencia al estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 5-2.

[0244] La concentración de cualquiera de los anticuerpos designados como anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 9 y 11 a 14, en los tejidos cerebrales, fue más de 25 veces mayor a la del control. La concentración de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 5 y 6 fue más de 100 veces mayor a la del control, con el anticuerpo anti-hTfR No. 6, en particular, cuyo valor alcanzó aproximadamente 160 veces, tan alto como el del control. Los resultados indican que los anticuerpos designados como anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 9 y 11 a 14 se transfieren al cerebro, pasando activamente a través de la BBB.

[0245] Tabla 5-2

Anticuerpo No..	Tejidos cerebrales (μg/g de peso húmedo)l	Valor relativo al control
Control	0.003	1
1	0.141	47.0
2	0.126	42.0
3	0.0833	27.8
4	0.221	73.7
5	0.335	112
6	0.492	164
7	0.0855	28.5
8	0.133	44.3
9	0.112	37.3
11	0.103	34.3
12	0.215	71.7
13	0.127	42.3
14	0.213	71.0

[0246] Ejemplo 8 Análisis farmacocinético de anticuerpos anti-hTfR en mono

Cada uno de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 3 se administró por vía intravenosa una vez a un macaco cangrejero macho a una dosificación de 5.0 mg/kg, y 8 horas después de la administración, la irrigación corporal completa se llevó a cabo con solución salina fisiológica. Como control negativo, un mono que no había recibido anticuerpo anti-hTfR se sometió a irrigación corporal completa de la misma manera. Después de la irrigación, los tejidos cerebrales, incluyendo la médula oblonga, se extirparon. Al utilizar los tejidos cerebrales, la concentración del anticuerpo anti-hTfR se midió, y se

realizó tinción inmunohistoquímica. Por otro lado, los anticuerpos anti-hTfR empleados eran productos de purificación de los descritos en el Ejemplo 7.

[0247] La medición de la concentración de los anticuerpos anti-hTfR en tejidos cerebrales se llevó a cabo en gran medida siguiendo el procedimiento descrito a continuación. Tejidos cerebrales recolectados se dividieron en el cerebro, el cerebelo, el hipocampo y la médula oblonga, y se homogeneizaron respectivamente con RIPA Buffer (Wako Pure Chemical Industries Inc.) que contenía Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Inc.), y se centrifugaron para recolectar el sobrenadante. Se adicionó Affinipure Goat Anti Mouse IgG Fcγ pAb (Jackson ImmunoResearch Inc.), en 10 µl cada uno, a los pozos de una High Bind Plate (Meso Scale Diagnostics Inc.), y la placa se dejó reposar por una hora para inmovilizar el anticuerpo. Entonces, la placa se bloqueó por la adición de 150 µl de regulador SuperBlock Blocking en PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) a cada pozo y se agitó por una hora. Luego, 25 µl del sobrenadante de un homogenizado de tejido cerebral se adicionaron a cada pozo, y la placa se agitó por una hora. Entonces, 25 µl de Affinipure Goat Anti Mouse IgG Fab-Biotin (Jackson ImmunoResearch Inc.) se adicionaron a cada pozo, y la agitación se continuó por una hora. Entonces, 25 µl de SULFO-Tag-Streptavidin (Meso Scale Diagnostics Inc.) se adicionaron a cada pozo, y la agitación se continuó por media hora. A cada pozo se adicionaron 150 µl de Read Buffer T (Meso Scale Diagnostics Inc.), y la cantidad de luminiscencia de cada pozo se leyó en un lector Sector™ Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics). La cantidad del anticuerpo contenido por

gramo de cerebro (peso húmedo) (la concentración del anticuerpo anti-hTfR en tejidos cerebrales) se calculó al producir una curva estándar con base en mediciones de muestras estándar que contenían concentraciones conocidas del anticuerpo anti-hTfR, y luego interpolar la medición de cada una de las muestras con referencia al estándar.

[0248] El resultado de la medición de la concentración de los anticuerpos anti-hTfR en los tejidos cerebrales se muestra en la Tabla 6. Si bien se observó que cualquiera de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 3 se acumula en el cerebro, el cerebelo, el hipocampo y la médula oblonga, en su cantidad hubo una relación de anticuerpo anti-hTfR No. 1 < anticuerpo anti-hTfR No. 3 < anticuerpo anti-hTfR No. 2, lo que muestra lo más bajo con el anticuerpo anti-hTfR No. 1 y lo más alto en el anticuerpo anti-hTfR No. 2. En comparación con el anticuerpo anti-hTfR No. 1, la acumulación del anticuerpo anti-hTfR No. 2 fue de aproximadamente 4.3 veces en el cerebro, aproximadamente 6.6 veces en el cerebelo, aproximadamente 4.6 veces en el hipocampo y aproximadamente 2 veces en la médula oblonga. Estos resultados demuestran que estos 3 anticuerpos tienen una propiedad para pasar a través de la barrera hematoencefálica y acumularse en los tejidos cerebrales, y muestran que, al unir estos anticuerpos a un agente farmacéutico que necesita funcionar en los tejidos cerebrales, es posible dejar que esos agentes farmacéuticos se acumulen con eficiencia en los tejidos cerebrales.

[0249] Tabla 6

Anticuerpo No..	Cerebro	Cerebelo	Hipocampo	Médula oblonga
1	0.18	0.15	0.12	0.22
2	0.78	0.99	0.56	0.43
3	0.82	0.6	0.33	0.31

[0250] La tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-hTfR en estos tejidos cerebrales se llevó a cabo al utilizar los siguientes procedimientos descritos a continuación básicamente. Los tejidos recolectados se congelaron rápidamente a -80 °C en un Tissue-Tek Cryo 3DM (Sakura Finetek Inc.) para preparar bloques congelados de tejidos. Los bloques congelados se cortaron en secciones de 4 μm, y se fijaron a portaobjetos de vidrio recubiertos con MAS (Matsunami Glass Inc.). Las secciones de tejidos se hicieron reaccionar con paraformaldehído al 4% (Wako Pure Chemical Industries Inc.) por 5 minutos a 4 °C y se fijaron a portaobjetos de vidrio. Entonces, las secciones de tejidos se hicieron reaccionar con solución de metanol que contenía 0.3% de peróxido de hidrógeno (Wako Pure Chemical Industries Inc.) por 30 min para inactivar las peroxidasas endógenas. Luego, los portaobjetos de vidrio se bloquearon al hacer reaccionar regulador de bloqueo SuperBlock en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Entonces, las secciones de tejidos se hicieron reaccionar con Mouse IgG-Heavy and Light Chain Antibody (Bethyl Laboratories Inc.) por una hora a temperatura ambiente. Las secciones de tejidos se permitieron visualizar con sustrato DAB (3,3'-diaminobenzidina, Vector Laboratories Inc.), se contratiñeron con solución de hematoxilina de

Mayer (Merck Inc.), se incrustaron después de la deshidratación y aclarado, y se observaron bajo un microscopio óptico.

[0251] La Figura 1 muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-hTfR en la corteza cerebral. En la corteza cerebral de los monos con administración de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 3, se observó la tinción específica en los vasos sanguíneos (Figura 1 paneles (b) a (d), respectivamente). En particular, en la corteza cerebral de los monos con administración de los anticuerpos anti-hTfR No. 2 o 3, una tinción específica también se observó extensamente en la región del parénquima cerebral, fuera de los vasos sanguíneos (Figura 1 paneles (c) y (d), respectivamente). Por otro lado, no se observó tinción en la corteza cerebral del mono de control sin administración de anticuerpo anti-hTfR, lo que indica que casi no hubo tinción de fondo (Figura 1 panel (a)).

[0252] La Figura 2 muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-hTfR en el hipocampo. En el cerebro de los monos con administración de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 3, se observó la tinción específica de vasos sanguíneos (Figura 2 paneles (b) a (d), respectivamente). En particular, en el hipocampo de los monos con administración de los anticuerpos anti-hTfR No. 2 o 3, también se observó la tinción específica de células de tipo neuronal (Figura 2 paneles (c) y (d), respectivamente), y también se observó la tinción específica y extensiva de la región del parénquima cerebral, fuera de los vasos sanguíneos. Por otro lado, no se observó tinción en el hipocampo del mono de control sin administración de anticuerpo anti-hTfR, lo que indica que

casi no hubo tinción de fondo (Figura 2 panel (a)).

[0253] La Figura 3 muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-hTfR en el cerebelo. En el cerebelo de los monos con administración de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 3, se observó la tinción específica de vasos sanguíneos (Figura 3 paneles (b) a (d), respectivamente). En particular, en el cerebelo de los monos con administración de los anticuerpos anti-hTfR No. 2 o 3, también se observó la tinción específica de células de Purkinje (Figura 3 paneles (c) y (d), respectivamente). Por otro lado, no se observó tinción en el cerebelo del control sin anticuerpo anti-hTfR administrado, lo que indica que casi no hubo tinción de fondo (Figura 3 panel (a)).

[0254] A partir de los resultados anteriores de tinción inmunohistoquímica en el cerebro, el hipocampo y el cerebelo, se consideró que, mientras el anticuerpo anti-hTfR No. 1 puede unirse al hTfR existente en el endotelio de los vasos sanguíneos en el cerebro, una cantidad relativamente pequeña del mismo se transfiere al parénquima cerebral, en comparación con los anticuerpos anti-hTfR Nos. 2 y 3. Por otro lado, se encontró que los anticuerpos anti-hTfR Nos. 2 y 3 pueden unirse al hTfR existente en el endotelio de los vasos sanguíneos del cerebro y, después de unirse a hTfR, pasan a través de la barrera hematoencefálica y se transfieren al parénquima cerebral, y además, se captan en el parénquima cerebral y células de tipo neuronal en el hipocampo, y se captan por las células de Purkinje en el cerebelo.

[0255] Ejemplo 9 Preparación de anticuerpos anti-hTfR humanizados

Se ensayó la humanización de la secuencia de aminoácidos

incluida en las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 3, mostrados en la Tabla 1. A partir del anticuerpo anti-hTfR No. 1 se obtuvo una región variable de cadena ligera humanizada que tenía una de las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 158 a SEQ ID NO: 163, y una región variable de cadena pesada humanizada que tenía una de las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 166 a SEQ ID NO: 171.

A partir del anticuerpo anti-hTfR No. 2 se obtuvo una región variable de cadena ligera humanizada que tenía una de las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 174 a SEQ ID NO: 179, y una región variable de cadena pesada humanizada que tenía una de las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 182 a SEQ ID NO: 187.

A partir del anticuerpo anti-hTfR No. 3 se obtuvo una región variable de cadena ligera humanizada que tenía una de las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 190 a SEQ ID NO: 195, y una región variable de cadena pesada humanizada que tenía una de las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 204 a SEQ ID NO: 209.

[0256] Ejemplo 10 Construcción de genes que codifican anticuerpos anti-hTfR humanizados

Para cada uno de los anticuerpos anti-hTfR Nos. 1 a 3 arriba citados, se sintetizaron artificialmente fragmentos de DNA que contenían un gen codificante de la de longitud completa de la cadena ligera y de la cadena pesada, que tenía regiones variables de cadena

ligera y cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado, respectivamente. Al hacer esto, se adicionó una secuencia MluI y una secuencia codificante de un péptido líder, en este orden a partir del extremo 5', en el lado 5' del gen que codifica la de longitud completa de la cadena ligera, y en el lado 3' se adicionó una secuencia NotI. Y se adicionó una secuencia MluI y una secuencia codificante de un péptido líder, en este orden a partir del extremo 5', en el lado 5' del gen que codifica la de longitud completa de la cadena pesada, y en el lado 3' se adicionó una secuencia NotI. El péptido líder introducido, arriba citado, debe funcionar como señal de secreción cuando la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo humanizado se expresan en células de mamífero como células hospedadoras, a fin de que la cadena ligera y la cadena pesada se secreten fuera de las células.

[0257] Para la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR No. 1, se sintetizó un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 165), el cual incluía un gen codificante de la de longitud completa de la cadena ligera (la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 164 que tenía, en la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 163.

Para la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 1, se sintetizó un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 173), el cual incluía un gen codificante de la de longitud completa de la cadena pesada (la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 172 que tenía, en la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como

SEQ ID NO: 171.

La cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado, codificada por el fragmento de DNA definido como SEQ ID NO: 173, es IgG1.

[0258] Para la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR No. 2, se sintetizó un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 181), el cual incluía un gen codificante de la de longitud completa de la cadena ligera (la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 180 que tenía, en la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 179.

Para la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 2, se sintetizó un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 189), el cual incluía un gen codificante de la de longitud completa de la cadena pesada (la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 188 que tenía, en la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 187.

La cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado, codificada por el fragmento de DNA definido como SEQ ID NO: 189, es IgG1.

[0259] Para la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR No. 3, se sintetizó un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 197), el cual incluía un gen codificante de la de longitud completa de la cadena ligera (la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196 que tenía, en

la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 191.

Para la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3, se sintetizó un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 211), el cual incluía un gen codificante de la de longitud completa de la cadena pesada (la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 que tenía, en la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205.

La cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado, codificada por el fragmento de DNA definido como SEQ ID NO: 211, es IgG1.

[0260] En lo que se refiere a la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR No. 3, también se sintetizó,

un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 199) codificante de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera (la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 198 que tenía, en la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 193;

un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 201) codificante de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera (la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-3) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 200 que tenía, en la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 194;

un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 203) codificante de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera (la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-4) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 202 que tenía, en la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 195;

[0261] Más aún, para la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3, también se sintetizó un fragmento de DNA (SEQ ID NO: 213) codificante de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada (la cadena pesada IgG4 del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3) consistente en la secuencia de aminoácidos definida como SEQ NO: 212 que tenía, en la región variable, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205;

La cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado, codificada por el fragmento de DNA definido como SEQ ID NO: 213, es IgG4.

[0262] Ejemplo 11 Construcción de vector de expresión de anticuerpo anti-hTfR humanizado

El vector pEF/myc/nuc (Invitrogen Inc.) se digirió con KpnI y NcoI para cortar una región que incluía el promotor de EF-1α y su primer intrón, y este se escindió a extremos romos con DNA polimerasa T4. Una región que incluía el potenciador/promotor e intrón de CMV se retiró de pCI-neo (Invitrogen Inc.) al digerirlo con BglII y EcoRI, y el fragmento restante dejado de este modo se escindió a extremos romos con DNA polimerasa T4. A esto se insertó la región arriba mencionada que incluía el promotor de EF-1α y su primer intrón para

construir el vector pE-neo. Este vector, pE-neo, se digirió con SfiI y BstXI para retirar una región de aproximadamente 1 kb, incluyendo un gen de resistencia a neomicina. Se realizó PCR al emplear pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen) como plantilla y al utilizar el iniciador Hyg-Sfi5' (SEQ ID NO: 216) e iniciador Hyg-BstX3' (SEQ ID NO: 217) para amplificar el gen de higromicina. El gen de higromicina, amplificado de este modo, se digirió con SfiI y BstXI y se insertó en el vector pE-neo arriba citado, a partir del cual el gen de resistencia a neomicina se había retirado para construir un vector pE-hygr.

[0263] Los vectores pE-hygr y pE-neo se digirieron con MluI y NotI. El fragmento de DNA (SEQ ID NO: 165), codificante de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1, y el fragmento de DNA (SEQ ID NO: 173), codificante de la cadena pesada del anticuerpo, ambos sintetizados en el Ejemplo 10, se digirieron con MluI y NotI, y los fragmentos obtenidos de este modo se insertaron en el vector pE-hygr y vector pE-neo, respectivamente, entre sus sitios MluI y NotI. Los vectores, obtenidos de este modo, se utilizaron como vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1, pE-hygr(LC1), y como vector de expresión para la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1, pE-neo(HC1), en los experimentos descritos a continuación.

[0264] De manera análoga, el fragmento de DNA (SEQ ID NO: 181), codificante de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2, y el fragmento de DNA (SEQ ID NO: 189), codificante de la cadena pesada del anticuerpo, ambos sintetizados en el Ejemplo 10, se

digirieron con MluI y NotI, y los fragmentos obtenidos de este modo se insertaron en el vector pE-hygr y vector pE-neo, respectivamente, entre sus sitios MluI y NotI. Los vectores, obtenidos de este modo, se utilizaron como vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2, pE-hygr(LC2), y como vector de expresión para la cadena pesada del anticuerpo del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2, pE-neo(HC2), en los experimentos descritos a continuación.

[0265] Más aún, de la misma manera que arriba, el fragmento de DNA (SEQ ID NO: 197), codificante de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, y el fragmento de DNA (SEQ ID NO: 211), codificante de la cadena pesada del anticuerpo, ambos sintetizados en el Ejemplo 10, se digirieron con MluI y NotI, y los fragmentos obtenidos de este modo se insertaron en el vector pE-hygr y vector pE-neo, respectivamente, entre sus sitios MluI y NotI. Los vectores, obtenidos de este modo, se utilizaron como vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, pE-hygr(LC3), y como vector de expresión para la cadena pesada del anticuerpo, pE-neo(HC3), en los experimentos descritos a continuación.

[0266] Más aún, en lo que se refiere a la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR No. 3, los siguientes fragmentos, sintetizados en el Ejemplo 10, en particular:

el fragmento de DNA (SEQ ID NO: 199) que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2,

el fragmento de DNA (SEQ ID NO: 201) que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-3, y

el fragmento de DNA (SEQ ID NO: 203) que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-4,
se digirieron con MluI y NotI, y se insertaron en el vector pE-hygr entre los sitios MluI y NotI del mismo para construir

pE-hygr(LC3-2), un vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2,

pE-hygr(LC3-3), un vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-3, y

pE-hygr(LC3-4), un vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-4, respectivamente.

[0267] Además, de la misma manera que arriba, en lo que se refiere a la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3, el fragmento de DNA (SEQ ID NO: 213), codificante de la cadena pesada IgG4 del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, sintetizado en el Ejemplo 10, se digirió con MluI y NotI y se insertó en el vector pE-neo entre los sitios MluI y NotI del mismo para construir pE-neo(HC3-IgG4), un vector de expresión para la cadena pesada IgG4 del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3.

[0268] Ejemplo 12 Construcción de células para la expresión del anticuerpo anti-hTfR humanizado

Células CHO (CHO-K1: obtenidas de la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo) se transformaron con pE-hygr(LC1), el vector para la expresión de cadenas ligeras, y pE-neo(HC1), el vector para la expresión de cadenas pesadas, ambos construidos en el Ejemplo 11, de la siguiente manera al utilizar el GenePulser (Bio-Rad Inc.). La transformación de las células se realizó de la siguiente manera en su

totalidad. 5×Una cantidad de 10^5 células CHO-K1 se colocó en una caja de cultivo de 3.5 cm que contenía medio CD OptiCHO™ (Life Technologies Inc.) y se cultivaron durante la noche a 37 °C, 5% de CO_2. El medio se reemplazó con medio Opti-MEM™ I (Life Technologies Inc.) y las células se suspendieron a la densidad de 5 x 10^6 células/ml. Se tomaron 100 µl de la suspensión celular, a lo cual se adicionaron 5 µl de cada uno de una solución de pE-hygr(LC1) y DNA de plásmido pE-neo(HC1), ambos habiéndose diluido con medio Opti-MEM™ I a 100 µg/ml. Estos plásmidos se introdujeron en las células por electroporación al utilizar el GenePulser (Bio-Rad Inc.). Las células entonces se cultivaron durante la noche bajo condiciones de 37 °C, 5% de CO_2, y se sometieron a cultivo de selección en medio CD OptiCHO™ complementado con 0.5 mg/ml de higromicina y 0.8 mg/ml de G418.

[0269] Entonces, las células arriba seleccionadas, a través del cultivo de selección, se colocaron en placas de 96 pozos a fin de que no más de una célula pudiera colocarse por pozo al limitar la dilución. Las células entonces se cultivaron por aproximadamente 10 días a fin de que se formaran colonias monoclonales. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivos respectivos de los pozos en los cuales la colonia monoclonal se formó, la cantidad del anticuerpo humanizado contenido en los sobrenadantes de cultivos se determinó por ELISA, y se seleccionaron líneas celulares con alta expresión de anticuerpos humanizados.

[0270] El ELISA arriba citado se condujo de la siguiente manera en general. A cada pozo de placas de microtitulación de 96 pozos (Nunc Inc.) se adicionaron 100 µl de una solución de anticuerpos policlonales

de cabra anti-IgG humana, diluida con regulador de bicarbonato de sodio 0.05 M (pH 9.6) a 4 μg/ml, y la placa se dejó reposar por al menos una hora a temperatura ambiente, con el fin de permitir al anticuerpo adsorberse por las placas. Entonces, después de que cada pozo se lavó tres veces con una solución salina regulada de fosfatos (pH 7.4) complementada con 0.05% de Tween20 (PBS-T), 200 μl de Starting Block (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) se adicionaron a cada pozo, y las placas se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de que cada pozo se lavó con PBS-T tres veces, el sobrenadante de cultivo o el producto estándar de referencia de IgG humana, que se había diluido con un PBS complementado con 0.5% de BSA y 0.05% de Tween20 (PBS-BT) a las concentraciones apropiadas, se adicionó a cada pozo en una cantidad de 100 μl, y las placas se dejaron reposar por al menos una hora a temperatura ambiente. Después de que las placas se lavaron tres veces con PBS-T, 100 μl de solución de anticuerpos policlonales anti-IgG humana etiquetados con HRP, que se había diluido con PBS-BT, se adicionó a cada pozo, y las placas se dejaron reposar por al menos una hora a temperatura ambiente. Después de que los pozos se lavaron tres veces con PBS-T, 0.4 mg/ml de o-fenilendiamina en regulador de citratos-fosfatos (pH 5.0) se adicionaron a cada pozo en una cantidad de 100 μl, y los pozos se dejaron reposar por 8 a 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó ácido sulfúrico 1 mol/l a cada pozo en una cantidad de 100 μl para terminar la reacción, y la absorbancia para cada pozo se midió a 490 nm al utilizar un lector de placas de 96 pozos. Las células correspondientes a los pozos que exhibieron las mediciones

más altas se consideraron como línea celular con alta expresión para el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1. Esta se designó como línea celular de expresión de anticuerpo No. 1.

[0271] De la misma manera, células CHO se transformaron con el vector de expresión de cadenas ligeras pE-hygr(LC2) y el vector de expresión de cadenas pesadas pE-neo(HC2), ambos construidos en el Ejemplo 11, y se obtuvo una línea celular con alta expresión para el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2. Esta se designó como línea celular de expresión de anticuerpo No. 2.

[0272] Más aún, de la misma manera, células CHO se transformaron con el vector de expresión de cadenas ligeras pE-hygr(LC3) y el vector de expresión de cadenas pesadas pE-neo(HC3), ambos construidos en el Ejemplo 11, y se obtuvo una línea celular con alta expresión para el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3. Esta se designó como línea celular de expresión de anticuerpo No. 3.

[0273] Más aún, de la misma manera, células CHO se transformaron con el vector de expresión de cadenas ligeras pE-hygr(LC3-2) y el vector de expresión de cadenas pesadas pE-neo(HC3), ambos construidos en el Ejemplo 11, y se obtuvo una línea celular con alta expresión para el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2. Esta se designó como línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-2.

[0274] Más aún, de la misma manera, células CHO se transformaron con el vector de expresión de cadenas ligeras pE-hygr(LC3-3) y el vector de expresión de cadenas pesadas pE-neo(HC3), ambos construidos en el Ejemplo 11, y se obtuvo una línea celular con alta expresión para el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-3. Esta se

designó como línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-3.

[0275] Más aún, de la misma manera, células CHO se transformaron con el vector de expresión de cadenas ligeras pE-hygr(LC3-4) y el vector de expresión de cadenas pesadas pE-neo(HC3), ambos construidos en el Ejemplo 11, y se obtuvo una línea celular con alta expresión para el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-4. Esta se designó como línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-4.

[0276] Más aún, de la misma manera, células CHO se transformaron con el vector de expresión de cadenas ligeras pE-hygr(LC3) y el vector de expresión de cadenas pesadas pE-neo(HC3-IgG4), ambos construidos en el Ejemplo 11, y se obtuvo una línea celular con alta expresión para el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4). Esta se designó como línea celular de expresión de anticuerpo No. 3 (IgG4).

[0277] Más aún, de la misma manera, células CHO se transformaron con el vector de expresión de cadenas ligeras pE-hygr(LC3-2) y el vector de expresión de cadenas pesadas pE-neo(HC3-IgG4), ambos construidos en el Ejemplo 11, y se obtuvo una línea celular con alta expresión para el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4). Esta se designó como línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-2 (IgG4).

[0278] Ejemplo 13 Purificación de anticuerpos anti-hTfR humanizados

La línea celular de expresión de anticuerpo No. 1, línea celular de expresión de anticuerpo No. 2, línea celular de expresión de anticuerpo No. 3, línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-2, línea

celular de expresión de anticuerpo No. 3-3 y línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-4, obtenidas en el Ejemplo 12, se diluyeron respectivamente con medio CD OptiCHO™ a la densidad de aproximadamente 2 x 10^5 células/ml. Las suspensiones celulares, en 200 ml, se adicionaron a un matraz cónico de 1 l, y se cultivaron por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 □, 5% de CO_2, 95% de aire, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm. Cada sobrenadante de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar el sobrenadante de cultivo. A cada sobrenadante de cultivo, obtenido de este modo, se adicionaron cinco volúmenes de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM, y se cargaron en una columna de Proteína A (volumen de columna: 1 ml, Bio-Rad Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Luego, la columna se lavó con cinco volúmenes de columna del mismo regulador, el anticuerpo humanizado adsorbido se eluyó con cuatro volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM, y la fracción eluida se recolectó. La fracción eluida se adicionó y neutralizó con regulador Tris 1 M (pH 8.0) y se utilizó como la preparación de anticuerpos purificados.

[0279] En lo anterior, el anticuerpo purificado a partir del sobrenadante de cultivo de la línea celular de expresión de anticuerpo No. 1 se designó como anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1. El anticuerpo purificado a partir del sobrenadante de cultivo de la línea celular de expresión de anticuerpo No. 2 se designó como anticuerpo anti-hTfR

humanizado No. 2. El anticuerpo purificado a partir del sobrenadante de cultivo de la línea celular de expresión de anticuerpo No. 3 se designó como anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3. El anticuerpo purificado a partir del sobrenadante de cultivo de la línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-2 se designó como anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2. El anticuerpo purificado a partir del sobrenadante de cultivo de la línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-3 se designó como anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-3. El anticuerpo purificado a partir del sobrenadante de cultivo de la línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-4 se designó como anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-4.

[0280] Más aún, la línea celular de expresión de anticuerpo No. 3 (IgG4) y la línea celular de expresión de anticuerpo No. 3-2 (IgG4), obtenidas en el Ejemplo 12, también se cultivaron de la misma manera que arriba, y a partir de sus sobrenadantes de cultivos se obtuvieron el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) y el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4) purificados, respectivamente. Estos dos anticuerpos se emplearon en el análisis farmacocinético al utilizar los monos descritos en el Ejemplo 15.

[0281] Ejemplo 14 Medición de la afinidad de los anticuerpos anti-hTfR humanizados para TfR humano y TfR de mono

La afinidad de los anticuerpos anti-hTfR humanizados obtenidos en el Ejemplo 13, para los TfR humano y de mono, se midió por el método descrito en el Ejemplo 7. La Tabla 7 muestra el resultado de la medición de la constante cinética de asociación (k_{on}), constante cinética de disociación (k_{off}) y constante de disociación (k_D) de los anticuerpos

anti-hTfR humanizados Nos. 1 a 3-4 (correspondientes a los Nos. 1 a 3-4, respectivamente , en la Tabla) para TfR humano.

[0282] Tabla 7

Anticuerpo, No.	kon ($M^{-1}s^{-1}$)	koff (s^{-1})	K_D (M)
1	3.93×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
2	1.97×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
3	1.19×10^6	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
3-2	6.06×10^5	1.45×10^{-5}	2.39×10^{-11}
3-3	6.00×10^5	1.25×10^{-5}	2.09×10^{-11}
3-4	1.01×10^6	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$

[0283] La Tabla 8 muestra el resultado de la medición de la constante cinética de asociación (k_{on}), constante cinética de disociación (k_{off}) y constante de disociación (k_D) de los anticuerpos anti-hTfR humanizados Nos. 1 a 3-4 (correspondientes a los Nos. 1 a 3-4, respectivamente , en la Tabla) para TfR de mono.

[0284] Tabla 8

Anticuerpo, No.	kon ($M^{-1}s^{-1}$)	koff (s^{-1})	K_D (M)
1	2.53×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$
2	4.87×10^5	3.67×10^{-5}	7.55×10^{-11}
3	6.03×10^5	6.76×10^{-4}	1.12×10^{-9}
3-2	4.95×10^5	8.76×10^{-4}	1.77×10^{-9}
3-3	4.88×10^5	9.32×10^{-4}	1.91×10^{-9}
3-4	5.19×10^5	1.35×10^{-4}	2.60×10^{-10}

[0285] El resultado de la medición de la afinidad de los anticuerpos

anti-hTfR humanizados Nos. 1 a 3-4 para TfR humano, mostró que la constante de disociación entre los anticuerpos anti-hTfR humanizados Nos. 1, 2, 3 y 3-4 y el TfR humano fue menor a 1 x 10^{-12} M (Tabla 7). Y la constante de disociación entre los anticuerpos anti-hTfR humanizados Nos. 3-2 y 3-3 y el TfR humano fue de 2.39 x 10^{-11} M y 2.09 x 10^{-11} M, respectivamente. Al mismo tiempo, la constante de disociación entre los anticuerpos anti-hTfR prehumanizados, correspondiente a esos anticuerpos y TfR humano, fue: 5.09×5.09 x 10^{-12} M para el anticuerpo No. 1, 1.12 x 10^{-11} M para el anticuerpo No. 2, y menos de 1 x 10^{-12} M para el anticuerpo No. 3 (Tabla 4). Estos resultados demuestran que la alta afinidad de los anticuerpos anti-hTfR prehumanizados, para el TfR humano, se mantuvo después de la humanización de los anticuerpos, e indican que los anticuerpos anti-hTfR Nos. 4 a 14 también podrían mantener su afinidad para el TfR humano después de su humanización.

[0286] Luego, al considerar el resultado de la medición de la afinidad de los anticuerpos anti-hTfR humanizados para TfR de mono, se observa que la constante de disociación del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1 fue menor a 1 x 10^{-12} M, lo que indica que la afinidad prehumanizada se mantuvo después de la humanización y también, en relación con el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2, la constante de disociación fue de 4.18 x 10^{-11} M antes de la humanización y 7.55 x 10^{-11} M después de la humanización, lo que indica que la afinidad se mantuvo (Tabla 5, Tabla 8). Por otro lado, con respecto a los anticuerpos anti-hTfR humanizados Nos. 3 a 3-4, aunque la constante de disociación del anticuerpo anti-hTfR No. 3, el anticuerpo

prehumanizado que les corresponde, para TfR de mono fue menor a 1 x 10^{-12} M, su constante de disociación después de la humanización fue de 2.60 x 10^{-10} M a 1.91 x 10^{-9} M, lo que muestra una reducción de la afinidad para TfR de mono. En lo que se refiere al anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, aunque se observó una reducción de la afinidad para TfR de mono, el resultado indica que la alta afinidad prehumanizada del anticuerpo anti-hTfR para TfR de mono no se perdió después de su humanización, sino se mantuvo en su totalidad. Esto indica que, en lo que se refiere a los anticuerpos anti-hTfR humanizados Nos. 4 a 14, también la afinidad prehumanizada para TfR de mono podría mantenerse después de su humanización.

[0287] Ejemplo 15 Análisis farmacocinético de anticuerpo anti-hTfR humanizado en mono

Utilizando monos, el análisis farmacocinético se realizó con cuatro anticuerpos: anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) y anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4). Por otro lado, la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 fue IgG1 mientras, en el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4), la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 se había convertido a IgG4, con su región variable mantenida intacta. Más aún, la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 fue IgG1 mientras, en el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4), la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 se había convertido a IgG4, con su región variable mantenida intacta. Estos cuatro anticuerpos se administraron respectivamente por vía intravenosa

una vez a macacos cangrejeros machos, a una dosificación de 5.0 mg/kg, y su sangre periférica se muestreó antes de la administración, 2 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas y 8 horas después de la administración, y luego se sometieron a irrigación corporal completa. Como control negativo, trastuzumab (Herceptin™, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), un anticuerpo humanizado para proteína HER2, se administró por vía intravenosa una vez a un solo mono de la misma manera, y su sangre periférica se muestreó antes de la administración, 2 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas y 8 horas después de la administración, y luego se sometió a la irrigación corporal completa. Después de la irrigación, los tejidos de cerebro y médula espinal, incluyendo la médula oblonga y otros tejidos (hígado, corazón, bazo y médula ósea) se extirparon. Al utilizar estos tejidos de cerebro y médula espinal y otros tejidos, la concentración de los anticuerpos anti-hTfR humanizados se midió y se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica.

[0288] La medición de la concentración de los anticuerpos anti-hTfR humanizados, en tejidos y sangre periférica, se llevó a cabo en gran medida siguiendo el procedimiento descrito a continuación. Por otro lado, en lo que se refiere al cerebro, los tejidos recolectados se separaron en la corteza cerebral, el cerebelo, el hipocampo y la médula oblonga, y luego se midió la concentración de los anticuerpos anti-hTfR humanizados. Los tejidos respectivos, obtenidos de este modo, se homogeneizaron con RIPA Buffer (Wako Pure Chemical Industries Inc.) que contenía Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Inc.), se centrifugaron y el sobrenadante se recolectó. A partir de la sangre

periférica anterior, se separó el suero. A cada pozo de una High Bind Plate (Meso Scale Diagnostics) se adicionaron 10 µl de Affinipure Goat Anti Mouse IgG Fcγ pAb (Jackson ImmunoResearch Inc.), y la placa se dejó reposar por una hora para proporcionar una fase sólida. Luego, 150 µl de regulador de bloqueo SuperBlock en PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) se adicionaron a cada pozo, y la placa se bloqueó por agitación de una hora. Luego, 25 µl del sobrenadante del homogenizado o el suero se adicionaron a cada pozo, y los pozos se agitaron por una hora. Entonces, 25 µl de Affinipure Goat Anti Mouse IgG Fab-Biotin (Jackson ImmunoResearch Inc.) se adicionaron a cada pozo, y la agitación se continuó por una hora. Entonces, 25 µl de SULFO-Tag-Streptavidin (Meso Scale Diagnostics Inc.) se adicionaron a cada pozo, seguido por agitación por media hora. A cada pozo se adicionaron 150 µl de Read Buffer T (Meso Scale Diagnostics Inc.), y la cantidad de luminiscencia de cada pozo se leyó en un lector Sector™ Imager 6000. La cantidad del anticuerpo contenido en cada tejido y la sangre periférica se calculó al producir una curva estándar con base en mediciones de muestras estándar que contenían concentraciones conocidas del anticuerpo anti-hTfR, y luego interpolar la medición de cada una de las muestras con referencia al estándar. La medición de la concentración se repitió tres veces para cada muestra.

[0289] El resultado de la medición de la concentración de anticuerpos anti-hTfR humanizados, en los tejidos de cerebro y médula espinal, se muestra en la Tabla 9.

[0290] Tabla 9

Anticuerpo No.	Corteza cerebral	Cerebelo	Hipocampo	Médula oblonga	Médula espinal
3	0.67±0.12	0.61±0.02	0.49±0.02	0.59±0.10	0.46±0.17
3-2	1.05±0.07	0.72±0.04	0.72±0.07	0.69±0.03	0.46±0.02
3(IgG4)	0.65±0.05	0.59±0.03	0.56±0.02	0.59±0.02	0.46±0.07
3-2(IgG4)	0.76±0.02	0.57±0.07	0.62±0.05	0.73±0.16	0.48±0.03
Control negativo	0.0082± 0.0032	0.0090± 0.0067	0.0053± 0.0009	0.011± 0.003	0.15± 0.04

[0291] Todos los anticuerpos, es decir, el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) y anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4), se observaron acumulados en la corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, médula oblonga y médula espinal (Tabla 9). La cantidad respectiva acumulada fue de la siguiente manera:

con el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, aproximadamente 82 veces en la corteza cerebral, aproximadamente 68 veces en el cerebelo, aproximadamente 92 veces en el hipocampo, aproximadamente 54 veces en la médula oblonga y aproximadamente 3.1 veces en la médula espinal, en comparación con el control negativo, trastuzumab (Herceptin™),

con el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2, aproximadamente 128 veces en la corteza cerebral, aproximadamente 80 veces en el cerebelo, aproximadamente 136 veces en el hipocampo, aproximadamente 63 veces en la médula oblonga y aproximadamente 3.1 veces en la médula espinal, en comparación con el control negativo, trastuzumab,

con el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4), aproximadamente 79 veces en la corteza cerebral, aproximadamente 66 veces en el cerebelo, aproximadamente 106 veces en el hipocampo, aproximadamente 54 veces en la médula oblonga y aproximadamente 3.1 veces en la médula espinal, en comparación con el control negativo, trastuzumab, y

con el anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4), aproximadamente 93 veces en la corteza cerebral, aproximadamente 63 veces en el cerebelo, aproximadamente 117 veces en el hipocampo, aproximadamente 66 veces en la médula oblonga y aproximadamente 3.2 veces en la médula espinal, en comparación con el control negativo, trastuzumab (Tabla 10).

Estos resultados indican que estos cuatro anticuerpos anti-hTfR humanizados tienen una propiedad que les permite pasar a través de la barrera hematoencefálica y acumularse en los tejidos cerebrales, y que ahora es posible dejar que los agentes farmacéuticos, que necesitan funcionar en los tejidos cerebrales, se acumulen con eficiencia ahí, al unir estos agentes farmacéuticos a uno de estos anticuerpos.

[0292] Tabla 10

Anticuerpo No.	Corteza cerebral	Cerebelo	Hipocampo	Médula oblonga	Médula espinal
3	82	68	92	54	3.1
3-2	128	80	136	63	3.1
3(IgG4)	79	66	106	54	3.1
3-2(IgG4)	93	63	117	66	3.2
Control negativo	1	1	1	1	1

[0293] Entonces, la Figura 4 muestra el resultado de la medición de la concentración de los anticuerpos anti-hTfR humanizados en los tejidos del hígado, corazón, bazo y médula ósea. Los cuatro anticuerpos anti-hTfR humanizados, así como el control negativo, trastuzumab, se observaron acumulados en el hígado y bazo, y su cantidad acumulada fue igual entre los cuatro anticuerpos anti-hTfR humanizados y el trastuzumab. En el corazón, los anticuerpos anti-hTfR humanizados tendieron a acumularse más que el trastuzumab, el control negativo, pero la cantidad sólo fue aproximadamente 1.5 a 2.8 veces la del control negativo. En la médula ósea, los anticuerpos anti-hTfR humanizados tendieron a acumularse marcadamente más que el trastuzumab, el control negativo, y la cantidad fue 3.5 a 16 veces la del control negativo. Se considera que la causa de esta acumulación de los anticuerpos anti-hTfR humanizados en la médula ósea es que el TfR se expresa en altos niveles en la médula ósea, órgano hematopoyético, y más anticuerpos anti-hTfR humanizados, por lo tanto, se acumulan a través de la unión a TfR, que en el control negativo. Estos datos indican que los cuatro anticuerpos anti-hTfR humanizados tienen una propiedad que les permite acumularse específicamente en el cerebro, cerebelo, hipocampo y médula oblonga, los cuales constituyen el sistema nervioso central, y que ahora es posible dejar que los agentes farmacéuticos, que necesitan funcionar en los tejidos cerebrales, se acumulen con eficiencia ahí, al unir estos agentes farmacéuticos a uno de estos anticuerpos.

[0294] Entonces, la Tabla 11 muestra el resultado de la medición farmacocinética de los anticuerpos anti-hTfR humanizados en la sangre. Como la del control negativo, trastuzumab, la concentración en sangre

de los cuatro anticuerpos anti-hTfR humanizados se mantuvo en niveles altos, superiores a 60 µg/ml, incluso ocho horas después de la administración, lo que indica que son estables en la sangre.

[0295] Tabla 11

Anticuerpo No.	Tiempo después de administración				
	2 min	30 min	2 h	4 h	8 h
3	173	147	128	117	97.5
3-2	124	99.5	78.5	76.5	61
3(IgG4)	141	113	99	95	83
3-2(IgG4)	132	111	98.5	99	95.5
Control negativo	124	92.5	96	75.5	60.5

[0296] La tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-hTfR humanizados en los tejidos cerebrales se realizó de la siguiente manera. Los tejidos recolectados se congelaron rápidamente a -80 °C en un Tissue-Tek Cryo 3DM (Sakura Finetek Inc.) para preparar bloques congelados de tejidos. Los bloques congelados se cortaron en secciones de 4 µm, que se fijaron a portaobjetos de vidrio recubiertos con MAS (Matsunami Glass Inc.). Las secciones de tejidos se hicieron reaccionar con paraformaldehído al 4% (Wako Pure Chemical Industries Inc.) por 5 minutos a 4 °C y se fijaron a portaobjetos de vidrio. Entonces, las secciones de tejidos se hicieron reaccionar con solución de metanol que contenía 0.3% de peróxido de hidrógeno (Wako Pure Chemical Industries Inc.) por 30 min para inactivar las peroxidasas endógenas. Luego, los portaobjetos de vidrio se bloquearon al hacer reaccionar regulador de bloqueo SuperBlock en PBS por 30 min a

temperatura ambiente. Entonces, las secciones de tejidos se hicieron reaccionar con Mouse IgG-Heavy and Light Chain Antibody (Bethyl Laboratories) por una hora a temperatura ambiente. Las secciones de tejidos se permitieron visualizar con sustrato DAB (3,3'-diaminobenzidina, Vector Laboratories Inc.), se contratiñeron con solución de hematoxilina de Mayer (Merck Inc.), se incrustaron después de la deshidratación y limpieza, y se observaron bajo un microscopio óptico.

[0297] La Figura 5 muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-hTfR humanizados en la corteza cerebral. La tinción específica de vasos sanguíneos y células de tipo neuronal se observó en la corteza cerebral de los monos con administración de anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) y anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4) (Figura 5 paneles (b) a (e), respectivamente). En la corteza cerebral del mono con administración del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2, en particular, (Figura 5 panel (c)), la región del parénquima cerebral, fuera de los vasos sanguíneos, también se observó teñida específicamente en forma extensa. Por otro lado, no se observó tinción en la corteza cerebral del mono con administración de Herceptin® como control, lo que indica que la tinción tisular observada en la Figura 5 paneles (b) a (e) fue específica para los anticuerpos anti-hTfR humanizados (Figura 5 panel (a)).

[0298] La Figura 6 muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-hTfR humanizados en el

hipocampo. La tinción específica de vasos sanguíneos y células de tipo neuronal se observó en el hipocampo de los monos con administración de anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) y anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4) (Figura 6 paneles (b) a (e), respectivamente). Por otro lado, no se observó tinción en el hipocampo del mono con administración de Herceptin® como control, lo que indica que la tinción tisular observada en la Figura 6 paneles (b) a (e) fue específica para los anticuerpos anti-hTfR humanizados (Figura 6 panel (a)).

[0299] La Figura 7 muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-hTfR humanizados en el cerebelo. La tinción específica de vasos sanguíneos y células de Purkinje se observó en el cerebelo de los monos con administración de anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) y anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4) (Figura 7 paneles (b) a (e), respectivamente). Por otro lado, no se observó tinción en el cerebelo del mono con administración de Herceptin® como control, lo que indica que la tinción tisular observada en la Figura 7 paneles (b) a (e) fue específica para los anticuerpos anti-hTfR humanizados (Figura 7 panel (a)).

[0300] La Figura 8 muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-hTfR humanizados en la médula oblonga. La tinción específica de vasos sanguíneos y células de tipo neuronal se observó en la médula oblonga de los monos con

administración de anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2, anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 (IgG4) y anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3-2 (IgG4) (Figura 8 paneles (b) a (e), respectivamente). Por otro lado, no se observó tinción en la médula oblonga del mono con administración de Herceptin® como control, lo que indica que la tinción tisular observada en la Figura 8 paneles (b) a (e) fue específica para los anticuerpos anti-hTfR humanizados (Figura 8 panel (a)).

[0301] A partir del resultado de la tinción inmunohistoquímica del cerebro y cerebelo en el Ejemplo 8, se había anticipado que, si bien el anticuerpo anti-hTfR No. 1, un anticuerpo de ratón prehumanizado, puede unirse a hTfR existente en el endotelio de los vasos sanguíneos en el cerebro, la cantidad que transfiere al parénquima cerebral podría ser pequeña. Por otro lado, se mostró que los anticuerpos anti-hTfR Nos. 2 y 3, anticuerpos de ratón prehumanizados, pueden unirse a hTfR existente en el endotelio de los vasos sanguíneos en el cerebro, y después de unirse a hTfR, pasan a través de la barrera hematoencefálica hacia el parénquima cerebral, y además captarse en el parénquima cerebral y células de tipo neuronal en el hipocampo, y en las células de Purkinje en el cerebelo.

[0302] A partir del resultado de la tinción inmunohistoquímica en el cerebro, hipocampo, cerebelo y médula oblonga en el Ejemplo 15, se reveló que los cuatro anticuerpos anti-hTfR humanizados probados, obtenidos al humanizar el anticuerpo anti-hTfR No. 3 sometido al experimento, pueden unirse a hTfR existente en el endotelio de los vasos sanguíneos del cerebro y, después de unirse al hTfR, pasar a

través de la barrera hematoencefálica y transferirse al parénquima cerebral, y además captarse en las células de tipo neuronal en la corteza cerebral, en el parénquima cerebral y las células de tipo neuronal en el hipocampo, en las células de Purkinje en el cerebelo, y en las células de tipo neuronal en la médula oblonga.

[0303] Ejemplo 16 Preparación de células de expresión de proteína de fusión hI2S-anticuerpo anti-hTfR humanizado

Al digerir el vector pEF/myc/nuc (Invitrogen Inc.) con KpnI y NcoI, se cortó una región que incluía el promotor de EF-1α y su primer intrón, la cual entonces se escindió a extremos romos con DNA polimerasa T4. Después de digerir pCI-neo (Invitrogen Inc.) con BglII y EcoRI para retirar una región que incluye el potenciador/promotor e intrón de CMV, el vector se escindió a extremos romos con DNA polimerasa T4, en el cual la región arriba mencionada, incluyendo el promotor de EF-1α y su primer intrón, se insertó para construir un vector pE-neo. El vector pE-neo se digirió con SfiI y BstXI para cortar una región de aproximadamente 1 kpb, incluyendo un gen de resistencia a neomicina. Al emplear pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen Inc.) como plantilla y al utilizar el iniciador Hyg-Sfi5' (SEQ ID NO: 216) e iniciador Hyg-BstX3' (SEQ ID NO: 217), se realizó una PCR para amplificar el gen de higromicina. El gen de higromicina, amplificado de este modo, se digirió con SfiI y BstXI y se insertó en el vector pE-neo arriba citado, del cual el gen de resistencia a neomicina se había retirado para construir el vector pE-hygr.

[0304] Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que tenía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 248, la cual

incluía un gen codificante de una proteína en la cual la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado, que tenía la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 172, se enlazó, en el lado C terminal del misma y mediante una secuencia enlazadora (Gly Ser), una hI2S que tenía la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 246. Este fragmento de DNA codificaba una proteína en la cual la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado, que tenía la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 247, se enlazó mediante una secuencia enlazadora (Gly Ser) a hI2S. Este fragmento de DNA tenía, en su lado 5', una secuencia MluI y una secuencia codificante de un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en su lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI del mismo, para construir el pE-neo(HC-I2S-1).

[0305] Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que tenía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 250, la cual incluía un gen codificante de una proteína en la cual la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado, que tenía la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 188, se enlazó, en el lado C terminal del misma y mediante una secuencia enlazadora (Gly Ser), una hI2S que tenía la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 246. Este fragmento de DNA codificaba una proteína en la cual la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado, que tenía la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 249, se enlazó mediante una secuencia enlazadora (Gly Ser) a hI2S. Este fragmento

de DNA tenía, en su lado 5', una secuencia MluI y una secuencia codificante de un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en su lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI del mismo, para construir el pE-neo(HC-I2S-2).

[0306] Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que tenía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 252, la cual incluía un gen codificante de una proteína en la cual la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado, que tenía la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210, se enlazó, en el lado C terminal del misma y mediante una secuencia enlazadora (Gly Ser), una hI2S que tenía la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 246. Este fragmento de DNA codificaba una proteína que tenía la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 251, en la cual la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado se enlazó, mediante una secuencia enlazadora (Gly Ser), a hI2S. Este fragmento de DNA tenía, en su lado 5', una secuencia MluI y una secuencia codificante de un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en su lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI del mismo, para construir el pE-neo(HC-I2S-3).

[0307] Células CHO (CHO-K1: obtenidas de la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo) se transformaron de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 12 con pE-neo(HC-I2S-1) y pE-hygr(LC1), los cuales se habían preparado en el Ejemplo 11, para

obtener una línea celular que expresa una proteína de fusión entre hI2S y un anticuerpo anti-hTfR humanizado. Esta línea celular se designó como línea celular 1 de expresión de hI2S-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hI2S y un anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por las líneas celulares, se designó como I2S-anticuerpo anti-hTfR 1.

[0308] De la misma manera, células CHO se transformaron con pE-neo(HC-I2S-2) y pE-hygr(LC2), los cuales se habían preparado en el Ejemplo 11, para obtener una línea celular que expresa una proteína de fusión entre hI2S y un anticuerpo anti-hTfR humanizado. Esta línea celular se designó como línea celular 2 de expresión de hI2S-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hI2S y un anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por las líneas celulares, se designó como I2S-anticuerpo anti-hTfR 2.

[0309] Además, de la misma manera, células CHO se transformaron con pE-neo(HC-I2S-3) y pE-hygr(LC3), los cuales se habían preparado en el Ejemplo 11, para obtener una línea celular que expresa una proteína de fusión entre hI2S y un anticuerpo anti-hTfR humanizado. Esta línea celular se designó como línea celular 3 de expresión de hI2S-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hI2S y un anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por las líneas celulares, se designó como I2S-anticuerpo anti-hTfR 3.

[0310] Ejemplo 17 Producción de I2S-anticuerpos anti-hTfR

I2S-anticuerpos anti-hTfR se produjeron por el siguiente método. Con medio CD OptiCHO^{TM}, las líneas celulares de expresión de hI2S-anticuerpos anti-hTfR 1, 2 y 3, obtenidas en el Ejemplo 16, se

diluyeron a la densidad de aproximadamente 2 x 10^5 células/ml, respectivamente. Las suspensiones celulares, en 200 ml, se adicionaron a matraces cónicos de 1 l correspondientes, y se cultivaron por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 □, 5% de CO_2, 95% de aire, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm. Cada sobrenadante de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar el sobrenadante de cultivo. A cada sobrenadante de cultivo, obtenido de este modo, se adicionaron cinco volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM, y se cargaron en una columna de Proteína A (volumen de columna: 1 ml, Bio-Rad Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Luego, la columna se lavó con cinco volúmenes de columna del mismo regulador, la I2S-anticuerpo anti-hTfR adsorbida se eluyó con cuatro volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM. El pH del eluato que contenía I2S-anticuerpo anti-hTfR se ajustó a pH 7.0 con regulador Tris 1 M (pH 8.0), y luego el regulador se reemplazó con regulador de PBS al utilizar una membrana Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.) para obtener un producto purificado de I2S-anticuerpo anti-hTfR.

[0311] La afinidad de la I2S-anticuerpos anti-hTfR, producida de este modo, por los TfR humano y de mono, puede medirse, por ejemplo, por el método descrito en el Ejemplo 7. El análisis farmacocinético de la I2S-anticuerpos anti-hTfR, después de su administración intravenosa, puede conducirse, por ejemplo, por el método descrito en el Ejemplo 8.

Los efectos farmacológicos de la I2S-anticuerpos anti-hTfR pueden evaluarse, por ejemplo, al inyectar por vía intravenosa la I2S-anticuerpos anti-hTfR a ratones I2S-KO/hTfR KI, los cuales pueden obtenerse a través del apareamiento de ratones inactivados en el gen de iduronato 2-sulfatasa (ratones I2S-KO), ratones modelo para el síndrome de Hunter, con los ratones hTfR-KI descritos en el Ejemplo 7-2, y medir la reducción de los glucosaminoglicanos acumulados en el cerebro.

[0312] Ejemplo 18 Evaluación de la transferencia de I2S-anticuerpos anti-hTfR al cerebro - 1

Cada uno de los productos de purificación de la I2S-anticuerpo anti-hTfR 3, preparada en el Ejemplo 17, se inyectó por vía intravenosa a la dosis de 1 mg/kg, a ratones hTfR-KI generados por el método descrito en el Ejemplo 7-2 (grupo con administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR). Como control, hI2S recombinante (rhI2S) se inyectó por vía intravenosa, a la dosis de 1 mg/kg, a ratones hTfR-KI (grupo de control). Quince ratones hTfR-KI se dosificaron en el grupo con administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR, y tres en el grupo de control (machos, 15 a 18 semanas de edad). Por otra parte, la rhI2S utilizada en lo anterior se había preparado en concordancia con un método convencional, el cual se describió en una publicación de patente internacional (WO 2012/102998). También es posible utilizar Elaprase(R), un producto medicinal disponible en el mercado, como la rhI2S.

[0313] En un grupo con administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR, tres ratones se sometieron a irrigación corporal completa con solución

salina fisiológica después de 15 min, 1 h, 4 h, 8 h y 24 h, respectivamente, de la administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR 3, y se recolectaron los cerebros (cerebro y cerebelo). En lo que respecta al grupo de control, la irrigación corporal completa con solución salina fisiológica se llevó a cabo una hora después de la administración de rhI2S, y los cerebros (cerebro y cerebelo) se recolectaron. El peso (peso húmedo) del cerebro y cerebelo extirpados se obtuvo, y luego el cerebro y cerebelo se homogeneizaron con T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Inc.), y sus sobrenadantes se recolectaron después de la centrifugación. La cantidad de I2S-anticuerpo anti-hTfR contenida en el sobrenadante del homogenizado se midió para el grupo con administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR, y se calculó la cantidad de rhI2S contenida en el sobrenadante del homogenizado para el grupo de control por el método ECL descrito en los Ejemplos 20 y 21, respectivamente, y se calculó la cantidad de I2S-anticuerpo anti-hTfR (concentración de I2S-anticuerpo anti-hTfR en los tejidos cerebrales) así como la cantidad de rhI2S (concentración de rhI2S en los tejidos cerebrales) contenidas en 1 g del cerebro (peso húmedo). El resultado se muestra en la Tabla 12.

[0314] La concentración de I2S-anticuerpo anti-hTfR y rhI2S en los tejidos cerebrales, una hora después de la administración, fue de 0.368 ± 0.019 μg/g de peso húmedo y 0.00134 ± 0.00232 μg/g de peso húmedo, respectivamente, lo que muestra que la concentración de I2S-anticuerpo anti-hTfR alcanzó aproximadamente 270 veces la de rhI2S. El resultado indica que rhI2S, la cual pasa escasamente a través de la

barrera hematoencefálica, en general, y no se transfiere al cerebro, puede hacerse pasar a través de la barrera hematoencefálica y transferirse hacia los tejidos cerebrales, al combinarla con el anticuerpo anti-hTfR. Además, la concentración de la I2S-anticuerpo anti-hTfR en los tejidos cerebrales alcanzó 0.263 ± 0.038 μg/g de peso húmedo en sólo 15 min después de la administración, lo cual fue aproximadamente 200 veces la de rhI2S en los tejidos cerebrales una hora después de la administración. El resultado también indica que, al combinarse con el anticuerpo anti-hTfR, se hace posible dejar que hI2S se transfiera rápidamente hacia los tejidos cerebrales.

[0315] Tabla 12

Tiempo después de administración (h)	I2S-anticuerpo anti-hTfR	rhI2S
0.25	0.263±0.038	-
1	0.368±0.019	0.00134±0.00232
4	0.440±0.033	-
8	0.382±0.011	-
24	0.245±0.012	-

[0316] Ejemplo 19 Evaluación de la transferencia de I2S-anticuerpos anti-hTfR al cerebro - 2

El producto de purificación de la I2S-anticuerpo anti-hTfR 3, preparada en el Ejemplo 17, se administró por vía intravenosa una vez a macacos cangrejeros machos, a una dosificación de 5 mg/kg (grupo con administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR). De la misma manera, rhI2S se administró una vez a macacos cangrejeros machos, a una dosificación de 5 mg/kg (grupo rhI2S). La rhI2S empleada aquí se

había preparado en concordancia con un método convencional, el cual se describió en una publicación de patente internacional (WO 2012/102998). También es posible utilizar Elaprase(R), un producto medicinal disponible en el mercado, como la rhI2S. Dos monos se dosificaron en cada grupo. Ocho horas después de la administración, la irrigación corporal completa se llevó a cabo. Después de la irrigación, los tejidos cerebrales, incluyendo la médula cervical, se extirparon. Los tejidos cerebrales, extirpados de este modo, se separaron en la corteza cerebral, el cerebelo, el hipocampo y la médula cervical, y cada uno de ellos se homogeneizó con T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Inc.), se centrifugó y el sobrenadante se recolectó. La cantidad de la I2S-anticuerpo anti-hTfR, contenida en el sobrenadante del homogenizado, se midió en el grupo con administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR, y la cantidad de rhI2S, contenida en el sobrenadante del homogenizado en el grupo de control por el método ECL descrito en los Ejemplos 20 y 21, respectivamente. A partir de la medición obtenida de este modo, se calculó la cantidad de I2S-anticuerpo anti-hTfR contenida en 1 g (g en peso húmedo) de la corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y médula cervical (concentración de I2S-anticuerpo anti-hTfR en esos tejidos cerebrales), así como la cantidad de rhI2S (concentración de rhI2S en esos tejidos cerebrales). El resultado se muestra en la Figura 9.

[0317] La concentración de I2S-anticuerpo anti-hTfR en la corteza cerebral fue de aproximadamente 0.22 μg/g, en tanto que la de rhI2S fue de 0.035 μg/g. La concentración de I2S-anticuerpo anti-hTfR en el

cerebelo fue de aproximadamente 0.18 μg/g, en tanto que la de rhI2S fue de 0.02 μg/g. La concentración de I2S-anticuerpo anti-hTfR en el hipocampo fue de aproximadamente 0.25 μg/g, en tanto que la de rhI2S fue de 0.017 μg/g. Y la concentración de I2S-anticuerpo anti-hTfR en la médula cervical fue de aproximadamente 0.15 μg/g, en tanto que la de rhI2S fue de 0.039 μg/g. De este modo, la concentración de I2S-anticuerpo anti-hTfR en la corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y médula cervical se demostró de aproximadamente 6.3 veces, aproximadamente 9.0 veces, aproximadamente 14.7 veces y aproximadamente 3.8 veces la de rhI2S, respectivamente. El resultado indica que, al unir hI2S al anticuerpo anti-hTfR, se hace posible dejar que hI2S pase activamente a través de la barrera hematoencefálica y entren al cerebro con eficiencia. En particular, el que la concentración del I2S-anticuerpo anti-hTfR en el hipocampo sea aproximadamente tan alta como aproximadamente 12.5 veces la de rhI2S, indica que la administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR podría dejar que I2S exhiba su actividad en el hipocampo, entre otros. La encefalopatía en pacientes con síndrome de Hunter no puede mejorarse por la terapia de reemplazo enzimático con rhI2S convencional, dado que poca rhI2S puede pasar a través de la barrera hematoencefálica. En contraste, dado que I2S-anticuerpo anti-hTfR puede pasar a través de la barrera hematoencefálica, la administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR podría complementar la actividad de I2S en los tejidos cerebrales, tales como la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. Por lo tanto, la I2S-anticuerpo anti-hTfR (especialmente I2S-anticuerpo anti-hTfR 3) puede utilizarse como agente terapéutico para complementar la actividad de I2S en el

cerebro de pacientes con síndrome de Hunter. De este modo, al administrar I2S-anticuerpo anti-hTfR (especialmente I2S-anticuerpo anti-hTfR 3), la profilaxis y tratamiento de la encefalopatía en pacientes con síndrome de Hunter son posibles, lo cual es difícil por la terapia de reemplazo enzimático con rhI2S convencional. Es especialmente promisorio como agente terapéutico para pacientes con trastornos del hipocampo acompañados por síndrome de Hunter.

[0318] Ejemplo 20 Determinación cuantitativa de I2S-anticuerpo anti-hTfR por el método ECL

A cada pozo de una 96-well Streptavidin Gold Plate (Meso Scale Diagnostics Inc.), una placa recubierta con estreptoavidina, se adicionaron 150 µl de regulador de bloqueo SuperBlock en PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.), y la placa se dejó reposar por una hora para bloqueo. El Anti-Human Kappa Light Chain Goat IgG Biotin (Monkey Absorbed) (IBL Inc.), un anticuerpo etiquetado con biotina, se diluyó con regulador de bloqueo SuperBlock en PBS a 0.5 µg/ml. El anticuerpo anti-I2S humana etiquetado con SULFO se diluyó con regulador de bloqueo SuperBlock en PBS a 1.0 µg/ml. Las soluciones diluidas del anticuerpo etiquetado con biotina y el anticuerpo etiquetado con SULFO, en 25 µl cada una, se mezclaron con 25 µl de cada muestra, y se incubaron por una hora para preparar una muestra de reacción de anticuerpos.

[0319] Cada pozo de la placa, después de bloquear, se lavó con 200 µl de PBS-T (Sigma Inc.), y se adicionaron 25 µl de la muestra de reacción de anticuerpos, y se incubó por una hora. Después de la incubación, cada pozo de la placa se lavó con 200 µl de PBS-T, se adicionó Read

Buffer T (Meso scale Diagnostics Inc.) a cada pozo, y la cantidad de luminiscencia de cada pozo se midió en el Sector™ Imager 6000 (Meso scale Diagnostics Inc.). Una curva estándar se produjo sobre las mediciones de muestras estándar que contenían concentraciones conocidas de I2S-anticuerpo anti-hTfR, y la cantidad de I2S-anticuerpo anti-hTfR se determinó al interpolar la medición de cada una de las muestras con referencia al estándar.

[0320] Por otra parte, el anticuerpo anti-I2S humana, utilizado en lo anterior, fue un anticuerpo monoclonal obtenido al inmunizar ratones con rhI2S, como antígeno, que se había preparado en concordancia con un método convencional descrito en una publicación de patente internacional (WO 2012/102998). Se habían obtenido múltiples anticuerpos monoclonales. Como anticuerpo anti-I2S humana etiquetado con SULFO, un anticuerpo anti-I2S humana se etiquetó con SULFO al utilizar MSD SULFO-TAG NHS-Ester (Meso scale Diagnostics Inc.) en concordancia con el manual incorporado.

[0321] Ejemplo 21 Determinación cuantitativa de hI2S por el método ECL

A cada pozo de una 96-well Streptavidin Gold Plate (Meso Scale Diagnostics Inc.), una placa recubierta con estreptoavidina, se adicionaron 150 µl de regulador de bloqueo SuperBlock en PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.), y la placa se dejó reposar por una hora para bloqueo. El anticuerpo anti-I2S humana etiquetado con biotina se diluyó con regulador de bloqueo SuperBlock en PBS a 0.5 µg/ml. El anticuerpo anti-I2S humana etiquetado con SULFO se diluyó con regulador de bloqueo SuperBlock en PBS a 1.0 µg/ml. Las soluciones

diluidas del anticuerpo etiquetado con biotina y el anticuerpo etiquetado con SULFO, en 25 µl cada una, se mezclaron con 25 µl de cada muestra, y se incubaron por una hora para preparar una muestra de reacción de anticuerpos.

[0322] Cada pozo de la placa, después de bloquear, se lavó con 200 µl de PBS-T (Sigma Inc.), y se adicionaron 25 µl de la muestra de reacción de anticuerpos, y se incubó por una hora. Después de la incubación, cada pozo de la placa se lavó con 200 µl de PBS-T, se adicionó Read Buffer T (Meso scale Diagnostics Inc.) a cada pozo, y la cantidad de luminiscencia de cada pozo se midió en el Sector™ Imager 6000 (Meso scale Diagnostics Inc.). Una curva estándar se produjo sobre las mediciones de muestras estándar que contenían concentraciones conocidas de hI2S, y la cantidad de rhI2S se determinó al interpolar la medición de cada una de las muestras con referencia al estándar.

[0323] Por otra parte, el anticuerpo anti-I2S humana, utilizado en lo anterior, fue un anticuerpo monoclonal obtenido al inmunizar ratones con rhI2S, como antígeno, que se había preparado en concordancia con un método convencional descrito en una publicación de patente internacional (WO 2012/102998). Como anticuerpo anti-I2S humana etiquetado con SULFO, un anticuerpo anti-I2S humana se etiquetó con SULFO al utilizar MSD SULFO-TAG NHS-Ester (Meso scale Diagnostics Inc.) en concordancia con el manual incorporado. Además, como anticuerpo anti-I2S humana etiquetado con biotina, otro anticuerpo anti-I2S humana, aparte del que se empleó para etiquetarse con SULFO, se etiquetó con biotina al utilizar el Biotin Labelling Kit-NH_2 (Dojindo Laboratories Inc.) en concordancia con el manual

incorporado.

[0324] Ejemplo 22 Valoración del efecto farmacológico de la I2S-anticuerpo anti-hTfR

El efecto farmacológico de la I2S-anticuerpo anti-hTfR se evaluó al medir la concentración de los glucosaminoglicanos (GAG), de los que se sabía que se acumulan en los órganos de pacientes con síndrome de Hunter, quienes carecen genéticamente de actividad de hI2S. El producto de purificación de la I2S-anticuerpo anti-hTfR 3, preparada en el Ejemplo 17, se inyectó por vía intravenosa a ratones I2S-KO/hTfR-KI a una dosificación de 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.0 mg/kg (grupo con administración de 0.5 mg/kg, grupo con administración de 1.0 mg/kg y grupo con administración de 2.0 mg/kg). La administración se realizó con una frecuencia de una vez a la semana por cuatro semanas, los ratones se sacrificaron por desangramiento bajo anestesia cuatro semanas después de la primera administración, y el cerebro, hígado, pulmón y corazón se extirparon. Los órganos extirpados entonces se liofilizaron en un liofilizador (EYELA Inc.), se pulverizaron y su se midió peso seco. A 100 mg (peso seco) de cada una de las preparaciones de órganos secos se adicionó 1 ml de regulador Tris 0.5 M (pH 7.5), y se calentó por 10 min a aproximadamente 100 °C. Luego, se adicionó solución de Actinase E (Kaken Pharmaceutical Inc.) en 50 mg/ml a la preparación seca a fin de que 1 mg de actinasa E se adicionara a 50 mg (peso seco), la mezcla se incubó por 16 h a aproximadamente 60 °C para descomponer la proteína, y el calentamiento se continuó por 10 min a aproximadamente 100 °C. Después de la centrifugación por 10 min a 15,000 rpm, el sobrenadante

se recolectó. La cantidad de los GAG contenidos en el sobrenadante se midió al utilizar el equipo cuantitativo Wieslab™ sGAG (Euro-Diagnostica Inc.), y la cantidad de los GAG contenidos en 1 g (g de peso seco) de cada órgano se calculó. Por otra parte, como el grupo de control, se emplearon ratones I2S-KO/hTfR-KI sin administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR. Al mismo tiempo, se midió la cantidad de los GAG en los órganos de ratones de tipo silvestre. Este experimento se condujo con tres ratones I2S-KO/hTfR-KI (machos y hembras, 19 a 25 semanas de edad) en cada grupo de medición. Por otra parte, se emplearon tres ratones de tipo silvestre, machos y hembras, 19 a 25 semanas de edad.

[0325] El resultado se muestra en la Figura 10. Se observó que, en la totalidad del cerebro, hígado, pulmón y corazón, la concentración de GAG disminuyó significativamente en forma dependiente de la dosis por la administración de I2S-anticuerpo anti-hTfR (Figura 10 paneles (a) a (d)).

[0326] En el cerebro, la concentración de GAG fue de aproximadamente 2.66 μg/g en los tejidos cerebrales del grupo de control, en tanto que la concentración de GAG en los tejidos cerebrales de los grupos con administración de 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.0 mg/kg fue de aproximadamente 2.23 μg/g, aproximadamente 2.15 μg/g, aproximadamente 2.10 μg/g, respectivamente, lo que muestra una disminución dependiente de la dosis (Figura 10 panel (a)). La cantidad anormal de GAG en los tejidos cerebrales de los ratones I2S-KO/hTfR-KI puede determinarse como de aproximadamente 0.90 μg/g, es decir, la cantidad que permanece después de que la

concentración de GAG en los tejidos cerebrales de los ratones de tipo silvestre (aproximadamente 1.76 μg/g) se resta de la concentración de GAG en los tejidos cerebrales del grupo de control (aproximadamente 2.66 μg/g). De este modo, puede concluirse que aproximadamente 48%, aproximadamente 57% y aproximadamente 62% de los GAG acumulados anormalmente en los tejidos cerebrales de los ratones I2S-KO/hTfR-KI se descompusieron por el I2S-anticuerpo anti-hTfR administrado a las dosis de 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.0 mg/kg, respectivamente. El resultado indica que es posible descomponer y retirar los GAG acumulados anormalmente en los tejidos cerebrales de un paciente con síndrome de Hunter al administrar el I2S-anticuerpo anti-hTfR al paciente, y que la I2S-anticuerpo anti-hTfR (I2S-anticuerpo anti-hTfR 3, en particular) podría prevenir y tratar las lesiones cerebrales ocasionadas por la acumulación, entre otros factores, de los GAG o sus fragmentos observados en pacientes con síndrome de Hunter.

[0327] En el hígado, la concentración de GAG fue de aproximadamente 10.3 μg/g en el tejido hepático del grupo de control, en tanto que la concentración de GAG en el tejido hepático de los grupos con administración de 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.0 mg/kg fue de aproximadamente 2.2 μg/g, aproximadamente 2.0 μg/g, aproximadamente 1.9 μg/g, respectivamente, lo que muestra una disminución dependiente de la dosis (Figura 10 panel (b)). La porción anormal de la cantidad de GAG en el tejido hepático de los ratones I2S-KO/hTfR-KI puede determinarse como de aproximadamente 10 μg/g, es decir, la cantidad que permanece después de que la

concentración de GAG en el tejido hepático de los ratones de tipo silvestre (aproximadamente 0.3 μg/g) se resta de la concentración de GAG en el tejido hepático del grupo de control (aproximadamente 10.3 μg/g). De este modo, puede concluirse que no menos de 80% de los GAG acumulados anormalmente en el tejido hepático de los ratones I2S-KO/hTfR-KI se descompuso por el I2S-anticuerpo anti-hTfR administrado a las dosis de 0.5 a 2.0 mg/kg.

[0328] En el pulmón, la concentración de GAG fue de aproximadamente 10.5 μg/g en el tejido pulmonar del grupo de control, en tanto que la concentración de GAG en el tejido pulmonar de los grupos con administración de 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.0 mg/kg fue de aproximadamente 7.8 μg/g, aproximadamente 6.7 μg/g, aproximadamente 5.7 μg/g, respectivamente, lo que muestra una disminución dependiente de la dosis (Figura 10 panel (c)). La porción anormal de la cantidad de GAG en el tejido pulmonar de los ratones I2S-KO/hTfR-KI puede determinarse como de aproximadamente 9.0 μg/g, es decir, la cantidad que permanece después de que la concentración de GAG en el tejido pulmonar de los ratones de tipo silvestre (aproximadamente 1.5 μg/g) se resta de la concentración de GAG en el tejido pulmonar del grupo de control (aproximadamente 10.5 μg/g). De este modo, puede concluirse que aproximadamente 30%, aproximadamente 42% y aproximadamente 53% de los GAG acumulados anormalmente en el tejido pulmonar de los ratones I2S-KO/hTfR-KI se descompuso por el I2S-anticuerpo anti-hTfR administrado a las dosis de 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.0 mg/kg, respectivamente.

[0329] En el corazón, la concentración de GAG fue de aproximadamente 4.6 µg/g en el tejido cardíaco del grupo de control, en tanto que la concentración de GAG en el tejido cardíaco de los grupos con administración de 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.0 mg/kg fue de aproximadamente 2.2 µg/g, aproximadamente 2.0 µg/g y aproximadamente 1.5 µg/g, respectivamente, lo que muestra una disminución dependiente de la dosis (Figura 10 panel (d)). La porción anormal de la cantidad de GAG en el tejido cardíaco de los ratones I2S-KO/hTfR-KI puede determinarse como de aproximadamente 3.8 µg/g, es decir, la cantidad que permanece después de que la concentración de GAG en el tejido cardíaco de los ratones de tipo silvestre (aproximadamente 0.8 µg/g) se resta de la concentración de GAG en el tejido cardíaco del grupo de control (aproximadamente 4.6 µg/g). De este modo, puede concluirse que aproximadamente 63%, aproximadamente 70% y aproximadamente 81% de los GAG acumulados anormalmente en el tejido cardíaco de los ratones I2S-KO/hTfR-KI se descompuso por el I2S-anticuerpo anti-hTfR administrado a las dosis de 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.0 mg/kg, respectivamente.

[0330] Los resultados anteriores en el hígado, pulmón y corazón demuestran que el I2S-anticuerpo anti-hTfR descompone los GAG acumulados no sólo en el cerebro sino también en otros órganos. Esto indica que la I2S-anticuerpo anti-hTfR (especialmente la I2S-anticuerpo anti-hTfR 3), cuando se administra a pacientes con síndrome de Hunter como agente farmacéutico en terapia de reemplazo enzimático, podría complementar la totalidad de los órganos de los pacientes, incluyendo el

cerebro, con la enzima. También se indica que la I2S-anticuerpo anti-hTfR puede complementar la totalidad de los órganos de los pacientes, incluyendo el cerebro, con la enzima a través de su administración intravenosa.

[0331] Ejemplo 23 Método para medición de GAG

La medición de GAG se condujo de la siguiente manera en general, al utilizar el equipo cuantitativo Wieslab™ sGAG (EURO-DIAGNOSTICA Inc.), en concordancia con el manual operativo incorporado. Una muestra o una solución estándar (vacía o agua), en 50 µl cada una, se adicionó a un tubo de 1.5 ml. A cada tubo se adicionaron 50 µl de una solución de GuHCl, y se dejó tener lugar una reacción por 15 min a temperatura ambiente. Una solución SAT, en 50 µl, se adicionó a cada tubo, y una reacción se dejó proceder por 15 min a temperatura ambiente. Una solución en mezcla de agua/solución SAT/solución de reserva de Alcian Blue (9/5/1) se preparó y adicionó a los tubos, en 750 µl a cada uno, y una reacción se dejó proceder por 15 min a temperatura ambiente. El líquido de mezcla de reacción, obtenido de este modo, se centrifugó a 12500 x g por 15 min para retirar el sobrenadante. A cada tubo se adicionaron 500 µl de DMSO, y después de una agitación por 15 min para mezclar a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó para retirar el sobrenadante. Una solución Gu-Prop se adicionó a los tubos, en 500 µl a cada uno, y se mezcló al agitar por 15 min a temperatura ambiente. La solución de mezcla, preparada de este modo, se distribuyó, en 200 µl cada una, en los pozos de una placa de 96 pozos, y la absorbancia de cada pozo se midió a 600 nm al utilizar un lector de placas. Una curva

estándar se produjo sobre las mediciones de soluciones que contenían concentraciones conocidas de GAG, y la concentración de los GAG se determinó al interpolar la medición de cada muestra con referencia al estándar.

[0332] Ejemplo 24 Preparación de proteínas de fusión entre anticuerpo anti-hTfR humanizado y diversos péptidos fisiológicamente activos

Los experimentos llevados a cabo en los Ejemplos 1 a 22 arriba citados han mostrado que la I2S humana, enlazada al anticuerpo anti-hTfR humanizado, pasa a través de la barrera hematoencefálica, entra a los tejidos cerebrales y exhibe actividad de I2S en el cerebro. Luego, se prepararon proteínas de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado y diversos péptidos fisiológicamente activos para examinar si esas proteínas de fusión pasan a través de la BBB y entran a los tejidos cerebrales. Aquí, la eritropoyetina humana, arilsulfatasa A humana, PPT-1 humana, TPP-1 humana, α-L-iduronidasa humana, receptor de TNFα humano y N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (heparán N-sulfatasa) humana se seleccionaron como péptidos fisiológicamente activos a fusionarse con el anticuerpo anti-hTfR humanizado. Los vectores de expresión utilizados para expresar las proteínas de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado y los péptidos fisiológicamente activos, así como las proteínas de fusión resultantes, se prepararon de acuerdo con los Ejemplos 25 a 31 a continuación.

[0333] Ejemplo 25 Método para la preparación de una proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado y la eritropoyetina

humana

Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que comprendía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 258, que incluía el cDNA codificante de una proteína consistente en el anticuerpo anti-hTfR humanizado con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 y eritropoyetina humana (hEPO) con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 256 y enlazada, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, en el lado C terminal de la cadena pesada del anticuerpo. Este fragmento de DNA codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 257, que consiste en el anticuerpo anti-hTfR humanizado y hEPO, que se enlaza, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. El fragmento de DNA tiene, en el lado 5', una secuencia MluI y una secuencia que codifica un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en el lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI, para construir el pE-neo(HC-hEPO).

[0334] Por el método descrito en el Ejemplo 12, se transformaron células CHO con pE-neo(HC-hEPO) y pE-hygr(LC3), que se construyó en el Ejemplo 11, se obtuvo una línea celular que expresaba una proteína de fusión entre hEPO y el anticuerpo anti-hTfR humanizado. La línea celular se designó como línea celular de expresión de hEPO-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hEPO y el anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por esta línea celular, se

designó como EPO-anticuerpo anti-hTfR.

[0335] Las células de la línea celular de expresión de hEPO-anticuerpo anti-hTfR se diluyeron a la densidad de aproximadamente 2 x 10^5 células/ml con medio CD OptiCHO™, y 200 ml de la suspensión celular se adicionaron a un matraz cónico de 1 l y se cultivaron por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 °C, 5% de CO_2, 95% de air, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm. El medio de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar un sobrenadante de cultivo. Al sobrenadante de cultivo, recolectado de este modo, se adicionaron cinco volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM, y se cargaron en una columna de Proteína A (volumen de columna: 1 ml, Bio-Rad Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Luego, cinco volúmenes de columna del mismo regulador se suministraron para lavar la columna, y la EPO-anti-hTfR adsorbida se eluyó con cuatro volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM. El eluato que contenía la EPO-anticuerpo anti-hTfR se ajustó a pH 7.0 con regulador Tris 1 M (pH 8.0), y luego el regulador se intercambió por PBS al utilizar una membrana Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). La solución resultante se utilizó como el producto de purificación de EPO-anticuerpo anti-hTfR.

[0336] Ejemplo 26 Método para la preparación de una proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado y la arilsulfatasa A humana

Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que comprendía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 261, que incluía el cDNA codificante de una proteína consistente en el anticuerpo anti-hTfR humanizado con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 y arilsulfatasa A humana (hARSA) con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 259 y enlazada, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. Este fragmento de DNA codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 260, que consiste en el anticuerpo anti-hTfR humanizado y hARSA, que se enlaza, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. El fragmento de DNA tiene, en el lado 5', una secuencia MluI y una secuencia que codifica un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en el lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI, para construir el pE-neo(HC-hARSA).

[0337] Por el método descrito en el Ejemplo 12, se transformaron células CHO con pE-neo(HC-hARSA) y pE-hygr(LC3), que se construyó en el Ejemplo 11, se obtuvo una línea celular que expresaba una proteína de fusión entre hARSA y el anticuerpo anti-hTfR humanizado. La línea celular se designó como línea celular de expresión de hARSA-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hARSA y el anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por esta línea celular, se designó como hARSA-anticuerpo anti-hTfR.

[0338] Las células de la línea celular de expresión de hARSA-anticuerpo anti-hTfR se diluyeron a la densidad de aproximadamente 2 x 10^5 células/ml con medio CD OptiCHO™, y 200 ml de la suspensión celular se adicionaron a un matraz cónico de 1 l y se cultivaron por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 °C, 5% de CO_2, 95% de air, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm. El medio de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar un sobrenadante de cultivo. Al sobrenadante de cultivo, recolectado de este modo, se adicionaron cinco volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM, y se cargaron en una columna de Proteína A (volumen de columna: 1 ml, Bio-Rad Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Luego, cinco volúmenes de columna del mismo regulador se suministraron para lavar la columna, y la ARSA-anti-hTfR adsorbida se eluyó con cuatro volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM. El eluato que contenía la ARSA-anticuerpo anti-hTfR se ajustó a pH 7.0 con regulador Tris 1 M (pH 8.0), y luego el regulador se intercambió por PBS al utilizar una membrana Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). La solución resultante se utilizó como el producto de purificación de ARSA-anticuerpo anti-hTfR.

[0339] Ejemplo 27 Método para la preparación de una proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado y la PPT-1 humana

Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que comprendía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO:

264, que incluía el cDNA codificante de una proteína consistente en el anticuerpo anti-hTfR humanizado con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 y PPT-1 humana (hPPT-1) con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 262 y enlazada, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. Este fragmento de DNA codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 263, que consiste en el anticuerpo anti-hTfR humanizado y hPPT-1, que se enlaza, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. El fragmento de DNA tiene, en el lado 5', una secuencia MluI y una secuencia que codifica un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en el lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI, para construir el pE-neo(HC-hPPT-1).

[0340] Por el método descrito en el Ejemplo 12, se transformaron células CHO con pE-neo(HC-hPPT-1) y pE-hygr(LC3), que se construyó en el Ejemplo 11, se obtuvo una línea celular que expresaba una proteína de fusión entre hPPT-1 y el anticuerpo anti-hTfR humanizado. La línea celular se designó como línea celular de expresión de hPPT-1-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hPPT-1 y el anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por esta línea celular, se designó como PPT-1-anticuerpo anti-hTfR.

[0341] Las células de la línea celular de expresión de hPPT-1-anticuerpo anti-hTfR se diluyeron a la densidad de

aproximadamente 2 x 10^5 células/ml con medio CD OptiCHO™, y 200 ml de la suspensión celular se adicionaron a un matraz cónico de 1 l y se cultivaron por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 °C, 5% de CO_2, 95% de air, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm. El medio de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar un sobrenadante de cultivo. Al sobrenadante de cultivo, recolectado de este modo, se adicionaron cinco volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM, y se cargaron en una columna de Proteína A (volumen de columna: 1 ml, Bio-Rad Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Luego, cinco volúmenes de columna del mismo regulador se suministraron para lavar la columna, y la PPT-1-anti-hTfR adsorbida se eluyó con cuatro volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM. El eluato que contenía la PPT-1-anticuerpo anti-hTfR se ajustó a pH 7.0 con regulador Tris 1 M (pH 8.0), y luego el regulador se intercambió por PBS al utilizar una membrana Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). La solución resultante se utilizó como el producto de purificación de PPT-1-anticuerpo anti-hTfR.

[0342] Ejemplo 28 Método para la preparación de una proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado y la TPP-1 humana

Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que comprendía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 267, que incluía el cDNA codificante de una proteína consistente en el anticuerpo anti-hTfR humanizado con la secuencia de aminoácidos

definida como SEQ ID NO: 210 y TPP-1 humana (hTPP-1) con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 265 y enlazada, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. Este fragmento de DNA codifica una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 266, que consiste en el anticuerpo anti-hTfR humanizado y hTPP-1, que se enlaza, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. El fragmento de DNA tiene, en el lado 5', una secuencia MluI y una secuencia que codifica un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en el lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI, para construir el pE-neo(HC-hTPP-1).

[0343] Por el método descrito en el Ejemplo 12, se transformaron células CHO con pE-neo(HC-hTPP-1) y pE-hygr(LC3), que se construyó en el Ejemplo 11, se obtuvo una línea celular que expresaba una proteína de fusión entre hTPP-1 y el anticuerpo anti-hTfR humanizado. La línea celular se designó como línea celular de expresión de hTPP-1-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hTPP-1 y el anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por esta línea celular, se designó como TPP-1-anticuerpo anti-hTfR.

[0344] Las células de la línea celular de expresión de hTPP-1-anticuerpo anti-hTfR se diluyeron a la densidad de aproximadamente 2 x 10^5 células/ml con medio CD OptiCHO™, y 200 ml de la suspensión celular se adicionaron a un matraz cónico de 1 l y se

cultivaron por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 °C, 5% de CO_2, 95% de air, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm. El medio de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar un sobrenadante de cultivo. Al sobrenadante de cultivo, recolectado de este modo, se adicionaron cinco volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM, y se cargaron en una columna de Proteína A (volumen de columna: 1 ml, Bio-Rad Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Luego, cinco volúmenes de columna del mismo regulador se suministraron para lavar la columna, y la TPP-1-anti-hTfR adsorbida se eluyó con cuatro volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM. El eluato que contenía la TPP-1-anticuerpo anti-hTfR se ajustó a pH 7.0 con regulador Tris 1 M (pH 8.0), y luego el regulador se intercambió por PBS al utilizar una membrana Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). La solución resultante se utilizó como el producto de purificación de TPP-1-anticuerpo anti-hTfR.

[0345] Ejemplo 29 Método para la preparación de una proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado y la α-L-iduronidasa humana

Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que comprendía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 261, que incluía el cDNA codificante de una proteína consistente en el anticuerpo anti-hTfR humanizado con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 y α-L-iduronidasa humana (hIDUA)

con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 259 y enlazada, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. Este fragmento de DNA codifica una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 269, que consiste en el anticuerpo anti-hTfR humanizado y hIDUA, que se enlaza, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. El fragmento de DNA tiene, en el lado 5', una secuencia MluI y una secuencia que codifica un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en el lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI, para construir el pE-neo(HC-hIDUA).

[0346] Por el método descrito en el Ejemplo 12, se transformaron células CHO con pE-neo(HC-hIDUA) y pE-hygr(LC3), que se construyó en el Ejemplo 11, se obtuvo una línea celular que expresaba una proteína de fusión entre hIDUA y el anticuerpo anti-hTfR humanizado. La línea celular se designó como línea celular de expresión de hIDUA-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hIDUA y el anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por esta línea celular, se designó como IDUA-anticuerpo anti-hTfR.

[0347] Las células de la línea celular de expresión de hIDUA-anticuerpo anti-hTfR se diluyeron a la densidad de aproximadamente 2 x 10^5 células/ml con medio CD OptiCHO^{TM}, y 200 ml de la suspensión celular se adicionaron a un matraz cónico de 1 l y se cultivaron por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 °C, 5% de CO_2,

95% de air, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm. El medio de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar un sobrenadante de cultivo. Al sobrenadante de cultivo, recolectado de este modo, se adicionaron cinco volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM, y se cargaron en una columna de Proteína A (volumen de columna: 1 ml, Bio-Rad Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Luego, cinco volúmenes de columna del mismo regulador se suministraron para lavar la columna, y la IDUA-anti-hTfR adsorbida se eluyó con cuatro volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM. El eluato que contenía la IDUA-anticuerpo anti-hTfR se ajustó a pH 7.0 con regulador Tris 1 M (pH 8.0), y luego el regulador se intercambió por PBS al utilizar una membrana Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). La solución resultante se utilizó como el producto de purificación de IDUA-anticuerpo anti-hTfR.

[0348] Ejemplo 30 Método para la preparación de una proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado y el receptor de TNFα humano

Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que comprendía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 261, que incluía el cDNA codificante de una proteína consistente en el anticuerpo anti-hTfR humanizado con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 y receptor de TNFα humano (hTNFαR) con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 259 y

enlazada, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. Este fragmento de DNA codifica una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 269, que consiste en el anticuerpo anti-hTfR humanizado y hTNFαR, que se enlaza, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. El fragmento de DNA tiene, en el lado 5', una secuencia MluI y una secuencia que codifica un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en el lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI, para construir el pE-neo(HC-hTNFαR).

[0349] Por el método descrito en el Ejemplo 12, se transformaron células CHO con pE-neo(HC-hTNFαR) y pE-hygr(LC3), que se construyó en el Ejemplo 11, se obtuvo una línea celular que expresaba una proteína de fusión entre hTNFαR y el anticuerpo anti-hTfR humanizado. La línea celular se designó como línea celular de expresión de hTNFαR-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hTNFαR y el anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por esta línea celular, se designó como TNFαR-anticuerpo anti-hTfR.

[0350] Las células de la línea celular de expresión de hTNFαR-anticuerpo anti-hTfR se diluyeron a la densidad de aproximadamente 2 x 10^5 células/ml con medio CD OptiCHO™, y 200 ml de la suspensión celular se adicionaron a un matraz cónico de 1 l y se cultivaron por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 °C, 5% de CO_2, 95% de air, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm.

El medio de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar un sobrenadante de cultivo. Al sobrenadante de cultivo, recolectado de este modo, se adicionaron cinco volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM, y se cargaron en una columna de Proteína A (volumen de columna: 1 ml, Bio-Rad Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Luego, cinco volúmenes de columna del mismo regulador se suministraron para lavar la columna, y la hTNFαR-anti-hTfR adsorbida se eluyó con cuatro volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM. El eluato que contenía la TNFαR-anticuerpo anti-hTfR se ajustó a pH 7.0 con regulador Tris 1 M (pH 8.0), y luego el regulador se intercambió por PBS al utilizar una membrana Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). La solución resultante se utilizó como el producto de purificación de TNFαR-anticuerpo anti-hTfR.

[0351] Ejemplo 31 Método para la preparación de una proteína de fusión entre el anticuerpo anti-hTfR humanizado y la heparán N-sulfatasa humana

Se sintetizó artificialmente un fragmento de DNA que comprendía la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 276, que incluía el cDNA codificante de una proteína consistente en el anticuerpo anti-hTfR humanizado con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 y heparán N-sulfatasa humana (hSGSH) con la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 274 y enlazada, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena

pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. Este fragmento de DNA codifica una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 275, que consiste en el anticuerpo anti-hTfR humanizado y hSGSH, que se enlaza, mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal de la misma. El fragmento de DNA tiene, en el lado 5', una secuencia MluI y una secuencia que codifica un péptido líder que actúa como señal de secreción, en este orden desde el extremo 5', y una secuencia NotI en el lado 3'. El fragmento de DNA se digirió con MluI y NotI, y se insertó en el vector pE-neo, entre los sitios MluI y NotI, para construir el pE-neo(HC-hSGSH).

[0352] Por el método descrito en el Ejemplo 12, se transformaron células CHO con pE-neo(HC-hSGSH) y pE-hygr(LC3), que se construyó en el Ejemplo 11, se obtuvo una línea celular que expresaba una proteína de fusión entre hSGSH y el anticuerpo anti-hTfR humanizado. La línea celular se designó como línea celular de expresión de hSGSH-anticuerpo anti-hTfR. La proteína de fusión entre hSGSH y el anticuerpo anti-hTfR humanizado, expresada por esta línea celular, se designó como SGSH-anticuerpo anti-hTfR.

[0353] Las células de la línea celular de expresión de hSGSH-anticuerpo anti-hTfR se diluyeron a la densidad de aproximadamente 2 x 10^5 células/ml con medio CD OptiCHO^{TM}, y 200 ml de la suspensión celular se adicionaron a un matraz cónico de 1 l y se cultivaron por 6 a 7 días en un ambiente húmedo a 37 °C, 5% de CO_2, 95% de air, con agitación a una velocidad de aproximadamente 70 rpm. El medio de cultivo se recolectó por centrifugación, y se filtró a través

de un filtro de 0.22 μm (Millipore Inc.) para preparar un sobrenadante de cultivo. Al sobrenadante de cultivo, recolectado de este modo, se adicionaron cinco volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM, y se cargaron en una columna de Proteína A (volumen de columna: 1 ml, Bio-Rad Inc.) que se había equilibrado de antemano con tres volúmenes de columna de regulador Tris 20 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 150 mM. Luego, cinco volúmenes de columna del mismo regulador se suministraron para lavar la columna, y la SGSH-anti-hTfR adsorbida se eluyó con cuatro volúmenes de columna de regulador de glicina 50 mM (pH 2.8) que contenía NaCl 150 mM. El eluato que contenía la SGSH-anticuerpo anti-hTfR se ajustó a pH 7.0 con regulador Tris 1 M (pH 8.0), y luego el regulador se intercambió por PBS al utilizar una membrana Amicon Ultra 30 kDa (Millipore Inc.). La solución resultante se utilizó como el producto de purificación de SGSH-anticuerpo anti-hTfR.

[0354] Ejemplo 32 Evaluación de la transferencia de proteínas de fusión entre anticuerpo anti-hTfR humanizado y diversos péptidos fisiológicamente activos hacia el cerebro

Cada producto de purificación de EPO-anticuerpo anti-hTfR, ARSA-anticuerpo anti-hTfR, PPT-1-anticuerpo anti-hTfR, TPP-1-anticuerpo anti-hTfR, IDUA-anticuerpo anti-hTfR, TNFαR-anticuerpo anti-hTfR y SGSH-anticuerpo anti-hTfR, preparados en los Ejemplos 25 a 31 respectivamente, se administró por vía intravenosa una vez a un ratón hTfR-KI a una dosis de 3 mg/kg. Como control, una preparación de inmunoglobulina humana (Benesis: inmunoglobulina humana para inyección intramuscular, Mitsubishi

Tanabe Pharma Inc.) se inyectó por vía intravenosa una vez a un ratón hTfR-KI (17 a 28 semanas de edad) a una dosis de 3 mg/kg. Un solo ratón hTfR-KI (macho, 17 a 28 semanas de edad) se utilizó para la administración de cada una de las proteínas de fusión y el control.

[0355] Ocho horas después de la inyección intravenosa, cada ratón se sometió a irrigación corporal completa con solución salina fisiológica, y sus tejidos cerebrales se extirparon luego después de la irrigación. Los tejidos cerebrales extirpados luego se homogeneizaron con T-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Inc.), y el sobrenadante se recolectó después de la centrifugación. La concentración de la proteína de fusión, contenida en el sobrenadante recolectado del homogenizado, se midió por el siguiente método. Por otra parte, el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG Fc humana etiquetado con biotina utilizado, se preparó al etiquetar con biotina el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG Fc humana (Bethyl Inc.) con el Biotin Labelling Kit-NH_2 (Dojindo Laboratories Inc.) en concordancia con el manual incorporado. Además, el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG Fc humana etiquetado con SULFO utilizado, se preparó al etiquetar con SULFO el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG Fc humana (Bethyl Inc.) con MSD SULFO-TAG NHS-Ester (Meso scale Diagnostics Inc.) de acuerdo con el manual incorporado.

[0356] A cada pozo de una Streptavidin Gold Plate 96-Well (Meso scale Diagnostics Inc.) se adicionaron 150 µl de regulador de bloqueo SuperBlock en PBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se dejaron reposar por una hora a temperatura ambiente para bloquear la placa. El

anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG Fc humana etiquetado con biotina se diluyó a 0.5 μg/ml con regulador de bloqueo SuperBlock en PBS. El anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG Fc humana etiquetado con SULFO se diluyó a 1.0 μg/ml con regulador de bloqueo SuperBlock en PBS. Las soluciones diluidas de anticuerpo etiquetado con biotina y anticuerpo etiquetado con SULFO, en 25 μl cada una, se mezclaron con 25 μl de cada muestra, y se incubaron por una hora para preparar muestras para reacción de anticuerpos.

[0357] Después de que cada pozo de la placa bloqueada se lavara con 200 μl de PBS-T (Sigma Inc.), 25 μl de una muestra para reacción de anticuerpos se adicionaron al pozo y se incubó por una hora. Después de la incubación, cada pozo de la placa se lavó con 200 μl de PBS-T, y se adicionó Read Buffer T (Meso scale Diagnostics Inc.), y la cantidad de luminiscencia de cada pozo se midió en el Sector™ Imager 6000 (Meso scale Diagnostics Inc.). La cantidad de la proteína de fusión, contenida por gramo de tejidos cerebrales (g de peso húmedo) (la concentración de la proteína de fusión en los tejidos cerebrales), se calculó al producir una curva estándar sobre la mediciones de las muestras estándar que contenían concentraciones conocidas de la muestra, y luego interpolar la medición de cada una de las muestras con referencia al estándar. El resultado se muestra en la Tabla 13.

[0358] Cuando la concentración de la inmunoglobulina humana, el control, en los tejidos cerebrales se toma como valor unitario, los valores relativos de la concentración de EPO-anticuerpo anti-hTfR, ARSA-anticuerpo anti-hTfR, PPT-1-anticuerpo anti-hTfR, TPP-1-anticuerpo anti-hTfR, IDUA-anticuerpo anti-hTfR,

TNFαR-anticuerpo anti-hTfR y SGSH-anticuerpo anti-hTfR en los tejidos cerebrales son 4.33, 3.39, 4.87, 6.48, 5.62, 7.44 y 2.24, respectivamente, lo que demuestra que estos péptidos fisiológicamente activos, enlazados al anticuerpo anti-hTfR, se transfieren activamente hacia los tejidos cerebrales. El resultado, de este modo, indica que estas proteínas fisiológicamente activas, que usualmente no pasan a través de la barrera hematoencefálica, pueden hacerse pasar a través de la barrera hematoencefálica y entrar a los tejidos cerebrales al fusionarlas al anticuerpo anti-hTfR.

[0359] De este modo, los resultados anteriores indican que EPO-anticuerpo anti-hTfR puede utilizarse como agente terapéutico para la isquemia cerebral, ARSA-anticuerpo anti-hTfR, arilsulfatasa A como agente terapéutico para los trastornos del sistema nervioso central en la degeneración de materia blanca metacromática (leucodistrofia metacromática), PPT-1-anticuerpo anti-hTfR como agente terapéutico para los trastornos del sistema nervioso central en la lipofuscinosis ceroidea neuronal o enfermedad de Santavuori-Haltia, TPP-1-anticuerpo anti-hTfR como agente terapéutico para los trastornos del sistema nervioso central en la lipofuscinosis ceroidea neuronal o enfermedad de Jansky-Bielschowsky, IDUA-anticuerpo anti-hTfR como agente terapéutico para los trastornos del sistema nervioso central en el síndrome de Hurler o síndrome de Hurler-Scheie, SGSH-anticuerpo anti-hTfR como agente terapéutico para los trastornos del sistema nervioso central en el síndrome de Sanfilippo, IDUA-anticuerpo anti-hTfR como agente terapéutico para los trastornos del sistema nervioso central en el síndrome de Hurler o síndrome de Hurler-Scheie,

y TNFαR-anticuerpo anti-hTfR como agente terapéutico para la isquemia cerebral y encefalitis. Por otra parte, los resultados anteriores también indican que proteínas fisiológicamente activas de interés, que usualmente no pasan a través de la barrera hematoencefálica, pueden hacerse pasar a través de la barrera hematoencefálica y entrar a los tejidos cerebrales al fusionarlas con el anticuerpo anti-hTfR.

[0360] Tabla 13

Proteína de fusión	Concentración	Valor relativo al control
Control	0.0199	1
EPO-anticuerpo anti-hTfR	0.0862	4.33
ARSA-anticuerpo anti-hTfR	0.0675	3.39
PPT-1-anticuerpo anti-hTfR	0.0970	4.87
TPP-1-anticuerpo anti-hTfR	0.129	6.48
IDUA-1-anticuerpo anti-hTfR	0.112	5.62
TNFαR-anticuerpo anti-hTfR	0.148	7.44
SGSH-anticuerpo anti-hTfR	0.0445	2.24

Aplicabilidad industrial

[0361] El anticuerpo anti-hTfR de la presente invención, cuando se fusiona con proteínas fisiológicamente activas, compuestos de bajo peso molecular y similares de interés, puede hacerlos capaces de pasar a través de la barrera hematoencefálica, y por lo tanto, es altamente útil en la provisión de un medio para suministrar proteínas fisiológicamente activas al cerebro, compuestos de bajo peso molecular y similares, los cuales necesitan actuar en el sistema nervioso central.

Lista de símbolos de referencia

[0362] 1 Vaso sanguíneo

2 Parénquima cerebral

3 Células de tipo neuronal

4 células de Purkinje

Texto de libre acceso para listado de secuencias

[0363] SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos del enlazador ejemplificado 1

SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos del enlazador ejemplificado 2

SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos del enlazador ejemplificado 3

SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 7: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 9: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 11: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 12: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 13: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la

cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 14: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 15: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 16: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 17: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 18: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 19: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 21: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 22: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 23: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 24: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 25: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 26: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la

cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 27: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 28: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 29: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 30: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 31: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 32: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 33: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 34: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 35: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 36: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 37: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 38: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 39: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la

cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 40: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 41: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 42: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 43: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 44: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 45: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 46: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 47: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 48: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 49: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 50: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 51: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 52: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la

cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 53: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 54: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 55: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 56: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 57: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 58: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 59: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 60: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 61: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 62: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 63: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 64: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 65: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la

cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 66: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 67: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 68: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 69: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 70: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 71: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 72: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 73: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 74: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 75: Secuencia de aminoácidos de CDR3 en la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 76: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 77: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 78: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la

cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 79: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 80: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 81: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 82: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 83: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 84: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 85: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 86: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 87: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 88: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 89: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 90: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 91: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la

cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 92: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 93: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 94: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 95: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 96: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 97: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 98: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 99: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 100: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 101: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 102: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 103: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 104: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la

cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 105: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 106: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 107: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 108: Secuencia de aminoácidos de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 109: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 110: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 111: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 112: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 113: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 114: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 115: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 116: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 117: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la

cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 118: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 119: Secuencia de aminoácidos de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 120: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 121: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 122: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 123: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 124: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 125: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 126: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 127: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 128: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 129: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 130: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la

cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 131: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 132: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 133: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 134: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 135: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 136: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 137: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 138: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 139: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 140: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 141: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 142: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 143: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la

cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 144: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 145: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 146: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 147: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 148: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 149: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 150: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 151: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 152: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 153: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR1 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 154: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 155: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 156: Secuencia de aminoácidos 1 de CDR3 en la

cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 157: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR3 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 158: Secuencia de aminoácidos 1 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 159: Secuencia de aminoácidos 2 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 160: Secuencia de aminoácidos 3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 161: Secuencia de aminoácidos 4 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 162: Secuencia de aminoácidos 5 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 163: Secuencia de aminoácidos 6 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 164: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 165: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 166: Secuencia de aminoácidos 1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 167: Secuencia de aminoácidos 2 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 168: Secuencia de aminoácidos 3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 169: Secuencia de aminoácidos 4 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 170: Secuencia de aminoácidos 5 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 171: Secuencia de aminoácidos 6 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1

SEQ ID NO: 172: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable

SEQ ID NO: 173: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 1 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 174: Secuencia de aminoácidos 1 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 175: Secuencia de aminoácidos 2 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 176: Secuencia de aminoácidos 3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 177: Secuencia de aminoácidos 4 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 178: Secuencia de aminoácidos 5 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 179: Secuencia de aminoácidos 6 de la región

variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 180: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable

SEQ ID NO: 181: Secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 182: Secuencia de aminoácidos 1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 183: Secuencia de aminoácidos 2 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 184: Secuencia de aminoácidos 3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 185: Secuencia de aminoácidos 4 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 186: Secuencia de aminoácidos 5 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 187: Secuencia de aminoácidos 6 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2

SEQ ID NO: 188: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable

SEQ ID NO: 189: Secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la

cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 2 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 190: Secuencia de aminoácidos 1 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 191: Secuencia de aminoácidos 2 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 192: Secuencia de aminoácidos 3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 193: Secuencia de aminoácidos 4 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 194: Secuencia de aminoácidos 5 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 195: Secuencia de aminoácidos 6 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 196: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 2 como la región variable

SEQ ID NO: 197: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 2 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 198: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 4 como la región variable

SEQ ID NO: 199: Secuencia de nucleótidos que codifica la

secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 4 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 200: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 5 como la región variable

SEQ ID NO: 201: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 5 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 202: Anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable

SEQ ID NO: 203: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 6 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 204: Secuencia de aminoácidos 1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 205: Secuencia de aminoácidos 2 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 206: Secuencia de aminoácidos 3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 207: Secuencia de aminoácidos 4 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 208: Secuencia de aminoácidos 5 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 209: Secuencia de aminoácidos 6 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3

SEQ ID NO: 210: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 2 como la región variable

SEQ ID NO: 211: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 2 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 212: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (IgG4) del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 2 como la región variable

SEQ ID NO: 213: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (IgG4) del anticuerpo anti-hTfR humanizado No. 3 que contiene la secuencia de aminoácidos 2 como la región variable, secuencia sintética

SEQ ID NO: 214: Iniciador hTfR5', secuencia sintética

SEQ ID NO: 215: Iniciador hTfR3', secuencia sintética

SEQ ID NO: 216: Iniciador Hyg-Sfi5', secuencia sintética

SEQ ID NO: 217: Iniciador Hyg-BstX3', secuencia sintética

SEQ ID NO: 218: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 219: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 1

SEQ ID NO: 220: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 221: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 2

SEQ ID NO: 222: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 223: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 3

SEQ ID NO: 224: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 225: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 4

SEQ ID NO: 226: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 227: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 5

SEQ ID NO: 228: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 229: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 230: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 231: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 7

SEQ ID NO: 232: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 233: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

SEQ ID NO: 234: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 235: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 9

SEQ ID NO: 236: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 237: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 10

SEQ ID NO: 238: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 239: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 11

SEQ ID NO: 240: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 241: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 12

SEQ ID NO: 242: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 243: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 13

SEQ ID NO: 244: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 245: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 14

SEQ ID NO: 247: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 1 (humanizado

6) y hI2S

SEQ ID NO: 248: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 1 (humanizado 6) y hI2S, secuencia sintética

SEQ ID NO: 249: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 2 (humanizado 6) y hI2S

SEQ ID NO: 250: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 2 (humanizado 6) y hI2S, secuencia sintética

SEQ ID NO: 251: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hI2S, secuencia sintética

SEQ ID NO: 252: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hI2S, secuencia sintética

SEQ ID NO: 253: Secuencia de nucleótidos del DNA en el cual un gen de resistencia a neomicina, flanqueado por secuencias loxP, se colocó en el lado 3' del cDNA de un cDNA que codifica hTfR quimérico, secuencia sintética

SEQ ID NO: 254: Secuencia de nucleótidos del brazo 5' del vector de orientación, secuencia sintética

SEQ ID NO: 255: Secuencia de nucleótidos del brazo 3' del

vector de orientación, secuencia sintética

SEQ ID NO: 257: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hEPO

SEQ ID NO: 258: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hEPO, secuencia sintética

SEQ ID NO: 260: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hARSA

SEQ ID NO: 261: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hARSA, secuencia sintética

SEQ ID NO: 263: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hPPT-1

SEQ ID NO: 264: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hPPT-1, secuencia sintética

SEQ ID NO: 266: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hTPP-1

SEQ ID NO: 267: Secuencia de nucleótidos que codifica la

secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hTPP-1, secuencia sintética

SEQ ID NO: 269: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hIDUA

SEQ ID NO: 270: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hIDUA, secuencia sintética

SEQ ID NO: 272: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hTNFαR

SEQ ID NO: 273: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfRα No. 3 (humanizado 2) y hTNFαR, secuencia sintética

SEQ ID NO: 275: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hSGSH

SEQ ID NO: 276: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR No. 3 (humanizado 2) y hSGSH, secuencia sintética

SEQ ID NO: 277: Secuencia de aminoácidos del anticuerpo de cadena sencilla anti-hTfR

SEQ ID NO: 278: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 6

SEQ ID NO: 279: Secuencia de aminoácidos 2 de CDR2 en la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR de ratón No. 8

5

REIVINDICACIONES

Reivindicación 1

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en (1) a (14) a continuación:

(1) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o la secuencia de aminoácidos Trp-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 en CDR3;

(2) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 en CDR3;

(3) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o la secuencia de aminoácidos Lys-Val-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 en CDR3;

(4) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 en CDR3;

(5) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 en CDR3;

(6) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 en CDR3;

(7) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39 o la secuencia de aminoácidos Gln-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 en CDR3;

(8) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44 o la secuencia de aminoácidos Gly-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 en CDR3;

(9) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 49 o la secuencia de aminoácidos Phe-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 en CDR3;

(10) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 en CDR3;

(11) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 57 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 60 en CDR3;

(12) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64 o la secuencia de aminoácidos Trp-Ser-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 65 en CDR3;

(13) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70 en CDR3; y

(14) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 o SEQ ID NO: 74 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 en CDR3.

Reivindicación 2

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en (1) a (14) a continuación:

(1) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 en CDR3;

(2) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 13 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 en CDR3;

(3) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 en CDR3;

(4) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 en CDR3;

(5) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 en CDR3;

(6) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 en CDR1, la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 en CDR3;

(7) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 en CDR3;

(8) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 en CDR3;

(9) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 en CDR3;

(10) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 en CDR3;

(11) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 60 en CDR3;

(12) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 65 en CDR3;

(13) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70 en CDR3; y

(14) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 en CDR3.

Reivindicación 3

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, en la región variable de cadena ligera del mismo, tienen una homología no menor a 80% con las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en la cadena ligera de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

Reivindicación 4

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, en la región variable de cadena ligera del mismo, tienen una homología no menor a 90% con las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en la cadena ligera de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

Reivindicación 5

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 5 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una de las CDR en la

cadena ligera de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

Reivindicación 6

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una de las CDR en la cadena ligera de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

Reivindicación 7

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en (1) a (14) a continuación:

(1) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80 o SEQ ID NO: 81 en CDR3;

(2) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 85 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 87 en CDR3;

(3) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 89 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 91 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 93 en CDR3;

(4) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 95 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 o SEQ ID NO: 99 en CDR3;

(5) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 o SEQ ID NO: 101 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 103 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 105 en CDR3;

(6) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 107 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 108 o SEQ ID NO: 278 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 110 en CDR3;

(7) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 112 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 114 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 116 en CDR3;

(8) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 118 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 279 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 121 en CDR3;

(9) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 o SEQ ID NO: 125 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 o SEQ ID NO: 127 en CDR3;

(10) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 132 o SEQ ID NO: 133 en CDR3;

(11) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 o SEQ ID NO: 135 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 136 o SEQ ID NO: 137 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 o SEQ ID NO: 139 en CDR3;

(12) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 o SEQ ID NO: 145 en CDR3;

(13) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 147 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 149 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 150 o SEQ ID NO: 151 en CDR3; y

(14) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 o SEQ ID NO: 153 en

CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 o SEQ ID NO: 155 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 o SEQ ID NO: 157 en CDR3.

Reivindicación 8

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con la reivindicación 7, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en (1) a (14) a continuación:

(1) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80 en CDR3;

(2) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 en CDR3;

(3) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 en CDR3;

(4) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 96 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 en CDR3;

(5) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 en CDR1, la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 104 en CDR3;

(6) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 108 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 en CDR3;

(7) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 en CDR3;

(8) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 120 en CDR3;

(9) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 en CDR3;

(10) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 132 en CDR3;

(11) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 136 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 en CDR3;

(12) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 en CDR3;

(13) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 150 en CDR3; y

(14) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 en CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 en CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 en CDR3.

Reivindicación 9

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, en la región variable de cadena pesada del mismo, tienen una homología no menor a 80% con las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en la cadena pesada de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

Reivindicación 10

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, en la región variable de cadena pesada del mismo, tienen una homología no menor a 90% con las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, en la cadena pesada de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

Reivindicación 11

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 5 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una de las CDR en la cadena pesada de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

Reivindicación 12

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma por lo menos una de las CDR en la cadena pesada de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

Reivindicación 13

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del mismo se seleccionan de entre el grupo que consiste en (1) a (14) arriba citados:

(1) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o la secuencia de aminoácidos Trp-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80 o SEQ ID NO: 81 como CDR3;

(2) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 85 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 87 como CDR3;

(3) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, o la secuencia de aminoácidos Lys-Val-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 89 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 91 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 93 como CDR3;

(4) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o la secuencia de aminoácidos

Asp-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 95 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 97 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 o SEQ ID NO: 99 como CDR3;

(5) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 o SEQ ID NO: 101 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 103 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 105 como CDR3;

(6) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 107 como CDR1, la secuencia de aminoácidos

definida como SEQ ID NO: 108 o SEQ ID NO: 278 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 110 como CDR3;

(7) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39 o la secuencia de aminoácidos Gln-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 112 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 114 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 116 como CDR3;

(8) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44 o la secuencia de aminoácidos Gly-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 118 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 279 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 121 como CDR3;

(9) la región variable de cadena ligera que comprende la

secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 49 o la secuencia de aminoácidos Phe-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 o SEQ ID NO: 125 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 o SEQ ID NO: 127 como CDR3;

(10) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54 o la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 132 o SEQ ID NO: 133 como CDR3;

(11) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 57 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como

SEQ ID NO: 60 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 o SEQ ID NO: 135 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 136 o SEQ ID NO: 137 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 o SEQ ID NO: 139 como CDR3;

(12) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64 o la secuencia de aminoácidos Trp-Ser-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 65 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 o SEQ ID NO: 145 como CDR3;

(13) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69 o la secuencia de aminoácidos Tyr-Ala-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 147 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 149 como CDR2, y la

secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 150 o SEQ ID NO: 151 como CDR3; y

(14) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 o SEQ ID NO: 74 o la secuencia de aminoácidos Asp-Thr-Ser como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 o SEQ ID NO: 153 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 o SEQ ID NO: 155 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 o SEQ ID NO: 157 como CDR3.

Reivindicación 14

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con la reivindicación 13, en donde la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del mismo se seleccionan de entre el grupo que consiste en (1) a (14) arriba citados:

(1) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 6 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 8 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 10 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 76 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 78 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 80

como CDR3;

(2) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 11 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 13 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 15 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 82 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 84 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 86 como CDR3;

(3) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 16 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 18 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 20 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 88 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 90 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 92 como CDR3;

(4) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 21 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 23 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 25 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 94 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 96 como

CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 98 como CDR3;

(5) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 26 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 28 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 30 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 100 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 102 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 104 como CDR3;

(6) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 31 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 33 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 35 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 106 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 108 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 109 como CDR3;

(7) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 36 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 38 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 40 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 111 como CDR1,

la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 113 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 115 como CDR3;

(8) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 41 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 43 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 45 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 117 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 119 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 120 como CDR3;

(9) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 46 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 48 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 50 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 122 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 124 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 126 como CDR3;

(10) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 51 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 53 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 55 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 128 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 130 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 132 como CDR3;

(11) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 56 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 58 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 60 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 134 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 136 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 138 como CDR3;

(12) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 61 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 63 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 65 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 140 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 142 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 144 como CDR3;

(13) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 66 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 68 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 70

como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 146 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 148 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 150 como CDR3; y

(14) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 71 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 73 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 75 como CDR3; y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 152 como CDR1, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 154 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 156 como CDR3.

Reivindicación 15

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la secuencia de aminoácidos de cada una de CDR1, CDR2 y CDR3, en la cadena ligera y la cadena pesada del mismo, tiene una homología no menor a 80% con la secuencia de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de una de las combinaciones de la cadena ligera y la cadena pesada de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.

Reivindicación 16

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la secuencia de aminoácidos de cada una de CDR1, CDR2 y CDR3, en la cadena ligera y la cadena pesada del mismo, tiene una homología no menor a 90% con la secuencia de aminoácidos de CDR1, CDR2 y

CDR3 de una de las combinaciones de la cadena ligera y la cadena pesada de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.

Reivindicación 17

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 5 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos de por lo menos una CDR en cada una de la cadena ligera y la cadena pesada que forma una de las combinaciones de la cadena ligera y la cadena pesada, de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.

Reivindicación 18

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos de por lo menos una CDR en cada una de la cadena ligera y la cadena pesada que forma una de las combinaciones de la cadena ligera y la cadena pesada, de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.

Reivindicación 19

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la región variable de cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 y SEQ ID NO: 163, y en donde la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168,

SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 y SEQ ID NO: 171.

Reivindicación 20

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la región variable de cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 y SEQ ID NO: 179, y en donde la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 y SEQ ID NO: 187.

Reivindicación 21

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde la región variable de cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 y SEQ ID NO: 195, y en donde la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 y SEQ ID NO: 209.

Reivindicación 22

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana seleccionado de entre el grupo que consiste en (1) a (6) a continuación:

(1) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 163, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 171,

(2) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 179, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 187,

(3) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 191, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205,

(4) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 193, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205,

(5) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 194, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205, y

(6) un anticuerpo, en donde la región variable de cadena ligera

del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 195, y en donde la región variable de cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 205.

Reivindicación 23

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana seleccionado de entre el grupo que consiste en (1) a (10) a continuación:

(1) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 164; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 172,

(2) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 180; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 188,

(3) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210,

(4) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 198; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210,

(5) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 200; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de

aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210,

(6) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 202; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210,

(7) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212,

(8) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 198; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212,

(9) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 200; y de lo cual la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212, y

(10) un anticuerpo, en donde la cadena ligera del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 202; y en donde la cadena pesada del mismo comprende la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 212.

Reivindicación 24

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana que tiene una homología no menor a 80% con el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, para la secuencia de aminoácidos de la región variable de

cadena ligera y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada.

Reivindicación 25

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana que tiene una homología no menor a 90% con el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, para la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada.

Reivindicación 26

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 10 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23.

Reivindicación 27

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23.

Reivindicación 28

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 10 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo

con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23.

Reivindicación 29

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con la secuencia de aminoácidos que forma la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23.

Reivindicación 30

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 10 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con las secuencias de aminoácidos respectivas que forman la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23.

Reivindicación 31

Un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, en donde 1 a 3 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en relación con las secuencias de aminoácidos respectivas que forman la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23.

Reivindicación 32

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en donde el anticuerpo tiene una afinidad tanto por la región extracelular del receptor de transferrina humana como la región extracelular del receptor

de transferrina de mono.

Reivindicación 33

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con la reivindicación 32, en donde la constante de disociación de su complejo con la región extracelular del receptor de transferrina humana no es mayor a 1 x 10^{-8} M, y la constante de disociación de su complejo con la región extracelular del receptor de transferrina de mono no es mayor a 5 x 10^{-8} M.

Reivindicación 34

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en donde el anticuerpo es anticuerpo Fab, anticuerpo F(ab')$_2$ o anticuerpo F(ab').

Reivindicación 35

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla seleccionado de entre el grupo que consiste en scFab, scF(ab'), scF(ab')$_2$ y scFv.

Reivindicación 36

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con la reivindicación 35, en donde la cadena ligera y la cadena pesada del mismo se enlazan mediante una secuencia enlazadora.

Reivindicación 37

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con la reivindicación 35, en donde la cadena pesada se enlaza, mediante una secuencia enlazadora, a la cadena ligera en el lado

C terminal de la misma.

Reivindicación 38

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con la reivindicación 35, en donde la cadena ligera se enlaza, mediante una secuencia enlazadora, a la cadena pesada en el lado C terminal de la misma.

Reivindicación 39

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, en donde la secuencia enlazadora consiste en 8 a 50 residuos de aminoácidos.

Reivindicación 40

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con la reivindicación 39, en donde la secuencia enlazadora se selecciona de entre el grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, las secuencias de aminoácidos definidas como SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos que consiste en tres secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente, cada una definida como SEQ ID NO: 3.

Reivindicación 41

Una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, y la secuencia de aminoácidos de una proteína diferente (A) enlazada a la cadena ligera del anticuerpo en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

Reivindicación 42

Una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana y una proteína diferente (A),

en donde el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana es el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, y

en donde la proteína diferente (A) se enlaza a la cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

Reivindicación 43

La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 41 o 42, en donde la proteína diferente (A) se enlaza, mediante una secuencia enlazadora, a la cadena ligera en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

Reivindicación 44

La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 43, en donde la secuencia enlazadora consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos.

Reivindicación 45

La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 44, en donde la secuencia enlazadora comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en una sola glicina, una sola serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ

ID NO: 5, y las secuencias de aminoácidos que consisten en 1 a 10 de las mismas que se enlazan consecutivamente.

Reivindicación 46

Una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, y la secuencia de aminoácidos de una proteína diferente (A) enlazada a la cadena pesada del anticuerpo en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

Reivindicación 47

Una proteína de fusión de un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana y una proteína diferente (A),

en donde el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana es el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, y

en donde la proteína diferente (A) se enlaza a la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

Reivindicación 48

La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 46 o 47, en donde la proteína diferente (A) se enlaza, mediante una secuencia enlazadora, a la cadena pesada en el lado C terminal o el lado N terminal de la misma.

Reivindicación 49

La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 48, en donde la secuencia enlazadora consiste en 1 a 50 residuos de aminoácidos.

Reivindicación 50

La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 48, en donde la secuencia enlazadora comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en una sola glicina, una sola serina, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 5, y las secuencias de aminoácidos que consisten en 1 a 10 de las mismas que se enlazan consecutivamente.

Reivindicación 51

La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41 a 50, en donde la proteína diferente (A) es una proteína que se origina de humano.

Reivindicación 52

La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41 a 51, en donde la proteína diferente (A) se selecciona de entre el grupo que consiste en factor de crecimiento nervioso (NGF), enzimas lisosómicas, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF), neurotrofina 3, neurotrofina 4/5, neurotrofina 6, neuregulina 1, eritropoyetina, darbepoyetina, activina, factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interferón α, interferón β, interferón γ, interleucina 6, factor estimulante de colonias de

granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), citocinas, receptor del factor de necrosis tumoral α (receptor de TNF-α), ligandos de PD-1, enzimas que tienen actividad de degradación de amiloides β, anticuerpo anti-amiloide β, anticuerpo anti-BACE, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-TNF-α y otros anticuerpos medicinales.

Reivindicación 53

La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41 a 51, en donde la proteína diferente (A) es una enzima lisosómica, y en donde la enzima lisosómica se selecciona de entre el grupo que consiste en α-L-iduronidasa, iduronato 2-sulfatasa, glucocerebrosidasa, β-galactosidasa, proteína activadora de GM2, β-hexosaminidasa A, β-hexosaminidasa B, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, α-manosidasa, β-manosidasa, galactosilceramidasa, saposina C, arilsulfatasa A, α-L-fucosidasa, aspartilglucosaminidasa, α-N-acetilgalactosaminidasa, esfingomielinasa ácida, α-galactosidasa A, β-glucuronidasa, heparán N-sulfatasa, α-N-acetilglucosaminidasa, acetil CoA:α-glucosaminida N-acetiltransferasa, N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, ceramidasa ácida, amilo-1,6-glucosidasa, sialidasa, palmitoil proteína tioesterasa 1, tripeptidil-peptidasa 1, hialuronidasa 1, CLN1 y CLN2.

Reivindicación 54

La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41 a 51, en donde la proteína diferente (A) es iduronato

2-sulfatasa.

Reivindicación 55

La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 50, en donde la proteína diferente (A) es iduronato 2-sulfatasa humana, y en donde la proteína de fusión se selecciona de entre (1) a (3) a continuación:

(1) la proteína de fusión, en donde la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 164, y en donde la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana, y la cadena pesada enlazada completa tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 247.

(2) la proteína de fusión, en donde la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 180, y en donde la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana, y la cadena pesada enlazada completa tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 249, y

(3) la proteína de fusión, en donde la cadena ligera del anticuerpo anti-hTfR humanizado tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196, y en donde la cadena pesada del anticuerpo anti-hTfR humanizado se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana, y la cadena pesada enlazada completa tiene la

secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 251.

Reivindicación 56

La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 50, en donde la proteína diferente (A) es iduronato 2-sulfatasa humana, y en donde la proteína de fusión se selecciona de entre (1) a (3) a continuación:

(1) la proteína de fusión que comprende: la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 164; y la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 172 que se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana definida como SEQ ID NO: 246;

(2) la proteína de fusión que comprende: la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 180; y la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 188 que se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a la iduronato 2-sulfatasa humana definida como SEQ ID NO: 246;

(3) la proteína de fusión que comprende: la cadena ligera de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 196; y la cadena pesada de anticuerpo anti-hTfR humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 210 que se enlaza, en el lado C terminal de la misma y mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser, a

la iduronato 2-sulfatasa humana definida como SEQ ID NO: 246.

Reivindicación 57

La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 50, en donde la proteína diferente (A) es iduronato 2-sulfatasa humana, y en donde la proteína de fusión se selecciona de entre (1) a (3) a continuación:

(1) la proteína de fusión que comprende: el conjugado compuesto de iduronato 2-sulfatasa humana enlazada mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser a la cadena pesada en el lado C terminal de la misma; y la cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos del conjugado se define como SEQ ID NO: 247, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se define como SEQ ID NO: 164,

(2) la proteína de fusión que comprende: el conjugado compuesto de iduronato 2-sulfatasa humana enlazada mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser a la cadena pesada en el lado C terminal de la misma; y la cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos del conjugado se define como SEQ ID NO: 249, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se define como SEQ ID NO: 180, y

(3) la proteína de fusión que comprende: el conjugado compuesto de iduronato 2-sulfatasa humana enlazada mediante una secuencia enlazadora Gly-Ser a la cadena pesada en el lado C terminal de la misma; y la cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos del conjugado se define como SEQ ID NO: 251, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se define como SEQ ID NO: 196.

Reivindicación 58

Un fragmento de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos

del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

Reivindicación 59

Un fragmento de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 41 a 57.

Reivindicación 60

Un vector de expresión que comprende el fragmento de DNA de acuerdo con la reivindicación 58 o 59, que se incorpora en el mismo.

Reivindicación 61

Una célula de mamífero transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 60.

Reivindicación 62

Un complejo anticuerpo anti-receptor de transferrina humana-compuesto farmacológicamente activo, en donde la cadena ligera y/o la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 se enlaza a un compuesto farmacológicamente activo de bajo peso molecular que necesita dejarse pasar a través de la barrera hematoencefálica y exhibir la función del mismo en el cerebro.

Reivindicación 63

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con la reivindicación 62, en donde el compuesto farmacológicamente activo es cualquiera seleccionado de entre el grupo que consiste en fármaco anticanceroso, agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer, agente terapéutico para la enfermedad de

Parkinson, agente terapéutico para la enfermedad de Huntington, agente terapéutico para esquizofrenia, antidepresivo, agente terapéutico para esclerosis múltiple, agente terapéutico para esclerosis lateral amiotrófica, agente terapéutico para tumores del sistema nervioso central incluyendo tumor cerebral, agente terapéutico para la enfermedad de almacenamiento lisosómico acompañada de encefalopatía, agente terapéutico para glucogenosis, agente terapéutico para distrofia muscular, agente terapéutico para isquemia cerebral, agente terapéutico para enfermedades por priones, agente terapéutico para trastornos traumáticos del sistema nervioso central, agente terapéutico para enfermedades virales y bacterianas del sistema nervioso central, agente farmacéutico utilizado para recuperación después de cirugía cerebral, agente farmacéutico utilizado para recuperación después de cirugía de médula espinal, siRNA, ADN antisentido y péptido.

Reivindicación 64

El uso del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, para permitir a la proteína diferente (A), o un compuesto farmacológicamente activo de bajo peso molecular, pasar a través de la barrera hematoencefálica y exhibir la función del mismo en el cerebro.

Reivindicación 65

El uso del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, para la producción de un agente farmacéutico para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso

central, al enlazar al mismo la molécula de una proteína fisiológicamente activa o un compuesto de bajo peso molecular farmacológicamente activo para la condición patológica.

Reivindicación 66

Un método para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso central, que comprende administrar por vía parenteral, a un paciente con el trastorno, una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína fisiológicamente activa o compuesto de bajo peso molecular farmacológicamente activo para el trastorno, en forma de un conjugado con la molécula del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

Reivindicación 67

El uso del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 57, para hacer que la iduronato 2-sulfatasa humana pase a través de la barrera hematoencefálica y exhiba la función de la misma en el cerebro.

Reivindicación 68

El uso de la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 57 para la elaboración de un medicamento para administración parenteral, para el tratamiento de una condición patológica del sistema nervioso central que acompaña al síndrome de Hunter.

Reivindicación 69

Un método para el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central que acompaña al síndrome de Hunter, que comprende administrar por vía parenteral una cantidad terapéuticamente efectiva de

la proteína de fusión, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 57, a un paciente con la enfermedad.

RESUMEN

Se da a conocer un medio para convertir compuestos, los cuales tienen actividad fisiológica o farmacológica y son incapaces de pasar a través de la barrera hematoencefálica, a una forma que les permite pasar a través de la barrera hematoencefálica, así como compuestos convertidos de ese modo. El medio es un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, y los compuestos convertidos son conjugados moleculares entre una proteína fisiológicamente activa o un compuesto de bajo peso molecular farmacológicamente activo y un anticuerpo anti-receptor de transferrina humana.