# PÉPTIDO QUE TIENE AFINIDAD POR EL RECEPTOR DE TRANSFERRINA HUMANO

## CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere, en una modalidad de la misma, a un péptido que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano, el péptido se utiliza uniéndose a un compuesto (una proteína, un ácido nucleico, un compuesto de bajo peso molecular, o similar) que se debe hacer funcionar en el sistema nervioso central (CNS, por su siglas en inglés), para permitir que el compuesto pase a través de la barrera hematoencefálica, y un método de utilización del péptido.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] En los capilares que suministran sangre a la mayoría de los tejidos del cerebro, excepto en varias regiones, incluyendo los órganos circunventriculares (glándula pineal, hipófisis, área postrema y similares), las células endoteliales que forman el endotelio de los capilares están fuertemente unidas por fuertes uniones intercelulares, a diferencia de los capilares presentes en otros tejidos como los músculos. Por lo tanto, el transporte pasivo de sustancias de la sangre al cerebro se ve obstaculizado y, aunque hay excepciones, es difícil que las sustancias que no sean altamente liposolubles o que tengan un peso molecular pequeño (de 200 a 500 daltons o menos) y sean eléctricamente neutras cerca del pH fisiológico, migren de los capilares al parénquima cerebral. Este mecanismo que restringe el intercambio de materiales entre la sangre y el fluido tisular cerebral a través del endotelio capilar intracerebral se denomina barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés). Además, la barrera hematoencefálica también restringe el intercambio de materiales entre la sangre y los fluidos tisulares del cerebro, así como del sistema nervioso central, incluyendo el cerebro y la médula espinal.

[0003] Debido a la existencia de la barrera hematoencefálica, la mayoría de las células del sistema nervioso central mantienen su homeostasis bioquímica sin verse afectadas por las fluctuaciones en la concentración de sustancias tales como hormonas y citocinas en la sangre. Sin embargo, la existencia de la barrera hematoencefálica plantea problemas a la hora de desarrollar fármacos. Por ejemplo, con respecto a la mucopolisacaridosis tipo II (síndrome de Hunter), la cual es una enfermedad metabólica genética provocada por una deficiencia de iduronato-2-sulfatasa, se lleva a cabo una terapia de sustitución enzimática de administración intravenosa de iduronato-2-sulfatasa recombinante; sin embargo, en relación con las notables anomalías en el sistema nervioso central (CNS) reconocidas en el síndrome de Hunter, la terapia de sustitución enzimática es menos eficaz porque la iduronato-2-sulfatasa no puede atravesar la barrera hematoencefálica. Además, para las enfermedades del sistema nervioso central, como la enfermedad de Alzheimer y los tumores cerebrales, es necesario hacer que los fármacos lleguen al sistema nervioso central; sin embargo, los fármacos que no pueden atravesar la barrera hematoencefálica no pueden ejercer la eficacia farmacológica.

[0004] Se han desarrollado diversos métodos para permitir el paso a través de la barrera hematoencefálica de sustancias macromoleculares tales como proteínas que deberían actuar sobre el sistema nervioso central. Con respecto a estos métodos, se han reportado diversos métodos para modificar una sustancia macromolecular de modo que tenga afinidad por las proteínas de membrana presentes en las células endoteliales de los capilares intracerebrales. Los ejemplos de proteínas de membrana presentes en las células endoteliales de los capilares intracerebrales incluyen receptores para compuestos tales como insulina, transferrina, factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II), LDL y leptina. Entre ellos, se ha reportado que un anticuerpo contra el receptor de transferrina puede atravesar la barrera hematoencefálica y migrar al parénquima cerebral, y al unirse el anticuerpo a un fármaco que debe actuar en el sistema nervioso central, el anticuerpo puede suministrar el fármaco al cerebro (Literaturas de Patentes 1 a 8).

[0005] Además, en el año 2021 se comercializó un agente terapéutico para el síndrome de Hunter (IZCARGO (marca registrada)) en el cual la iduronato-2-sulfatasa está unida a un anticuerpo receptor antitransferrina, y el cual puede atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer la eficacia farmacológica en el sistema nervioso central (Literatura no relacionada con patentes 1).

**Lista de referencias**

**Literatura de patentes**

[0006] Literatura de patentes 1: US 2007/0082380

Literatura de patentes 2: US 2008/0152645

Literatura de patentes 3: US 2009/0053219

Literatura de patentes 4: US 2011/0110935

Literatura de patentes 5: US 2018/0171012

Literatura de patentes 6: US 2018/0179291

Literatura de patentes 7: US 2020/0317798

Literatura de patentes 8: US 2020/0384061

**Literatura no relacionada con patentes**

[0007] Literatura no relativa patentes 1: Prospecto de empaque "IZCARGO para infusión intravenosa por goteo 10 mg", marzo de 2021 (1ª edición).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

**Problema técnico**

[0008] En las circunstancias descritas anteriormente, un objeto de la presente invención es proporcionar un péptido que tiene afinidad por un receptor de transferrina humano, el cual se puede utilizar por unión a un compuesto (una proteína, un ácido nucleico, un compuesto de bajo peso molecular, o similares) que debe ser provocado para funcionar en el sistema nervioso central (CNS) con el fin de permitir que ese compuesto atraviese la barrera hematoencefálica, y un método de uso del péptido.

**Solución al problema**

[0009] En investigaciones dirigidas al objeto descrito anteriormente, los inventores de la presente invención llevaron a cabo amplias investigaciones, y como resultado, los inventores encontraron que un péptido que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano (hTfR), el péptido se obtiene por un método de producción descrito en detalle en la presente memoria descriptiva y contiene una región variable de un anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada que reconoce específicamente la región extracelular del hTfR (péptido de región variable de anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada), atraviesa eficazmente la barrera hematoencefálica, completando así la presente invención. Es decir, la presente invención incluye lo siguiente. Por cierto, en las invenciones descritas en los siguientes números 1 a 104, un péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano puede sustituirse por un péptido que contiene una región variable de un anticuerpo de cadena pesada, y también se puede sustituir un péptido por una proteína.

1. Un péptido que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano (péptido de afinidad por el receptor de transferrina humano), el péptido que comprende una región variable de un anticuerpo de cadena pesada que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, y que se selecciona del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (5):

(1) un péptido en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:9, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13;

(2) un péptido en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:15, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:17 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:19;

(3) un péptido en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:23 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25;

(4) un péptido en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:27, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30 o SEQ ID NO:31; y

(5) un péptido en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56 o SEQ ID NO:57 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25.

2. Un péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano seleccionado del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (6):

(1) un péptido que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos del 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 y que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en (1) de la reivindicación 1;

(2) un péptido que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos del 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 y que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en (2) de conformidad con la reivindicación 1;

(1) un péptido que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos del 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en (3) de la reivindicación 1;

(4) un péptido que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos del 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 y que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en (4) de conformidad con la reivindicación 1;

(5) un péptido que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos del 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en (3) de la reivindicación 1;

(6) un péptido que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos del 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en (5) de la reivindicación 1;

3. El péptido humano de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 2 anterior, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos es de 85 % o superior.

4. El péptido humano de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 2 anterior, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos es de 90 % o superior.

5. El péptido humano de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 2 anterior, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos es de 95 % o superior.

6. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 1 anterior, en donde el péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano contiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (6):

(1) la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10

aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:9, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13;

(2) la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:15, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:17 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:19;

(3) la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:23 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25;

(4) la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:27, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30 o SEQ ID NO:31;

(5) la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:23 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25; y

(6) la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 o SEQ ID NO:56 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25.

7. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 5 anterior, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o adicionados es de

1 a 5.

8. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 5 anterior, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o adicionados es de 1 a 3.

9. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con cualquiera de los números 1 a 8, en donde el péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano tiene afinidad tanto con la región extracelular del receptor de transferrina humano como por la región extracelular del receptor de transferrina de mono.

10. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 9, en donde una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humano es de $5\times10^{-9}$ a $1\times10^{-7}$.

11. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 9, en donde una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humano es de $8\times10^{-9}$ a $2\times10^{-8}$.

12. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 9, en donde cuando el valor de la constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humano se toma como 1, el valor de una constante de disociación con el receptor de transferrina de mono es de 0.5 a 2.5.

13. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 9, en donde cuando el valor de la constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humano se toma como 1, el valor de una constante de disociación con el receptor de transferrina de mono es de 0.7 a 1.2.

14. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual se une una pluralidad del péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con cualquiera de los números 1 a 13 anteriores, el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (3):

(1) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual 2 a 10 de los péptidos de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con los números 1 a 12 anteriores están enlazados directamente o por medio de un enlazador;

(2) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual 2 o 3 de los péptidos de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con los números 1 a 12 anteriores están enlazados directamente o por medio de un enlazador; y

(3) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual dos de los péptidos de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con los números 1 a 12 anteriores están enlazados directamente o por medio de un enlazador;

15. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 14 anterior, en donde el enlazador para enlazar una pluralidad del péptido de afinidad con el

receptor de transferrina humano es un enlazador peptídico que consiste en 1 a 50 aminoácidos.

16. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 14 anterior, en donde la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico para enlazar una pluralidad del péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano se selecciona del grupo que consiste en un solo aminoácido, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:58 y SEQ ID NO:69.

17. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 14 anterior, en donde la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico para enlazar los péptidos de región variable del anticuerpo de cadena pesada es la secuencia de aminoácidos en la cual 2 a 10 de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en un solo aminoácido, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:58, y SEQ ID NO:69, están enlazadas en tándem.

18. Un complejo péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano-fármaco, en donde el péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con cualquiera de los números 1 a 17 anteriores está enlazado a un fármaco.

19. El complejo de acuerdo con el número 18 anterior, en donde el fármaco es cualquiera de una proteína diferente (A), un ácido nucleico o un compuesto de bajo peso molecular.

20. Una proteína de fusión que comprende:

el péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con cualquiera de los números 1 a 17 anteriores y

una proteína diferente (A).

21. La proteína de fusión de acuerdo con el número 20 anterior, en donde el péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano está unido al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un enlazador.

22. La proteína de fusión de acuerdo con el número 20 anterior, en donde el péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano está unido al N-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un enlazador.

23. La proteína de fusión de acuerdo con los números 21 o 22 anteriores, en donde el enlazador es un enlazador peptídico que consiste en 1 a 50 aminoácidos.

24. La proteína de fusión de acuerdo con el número 23 anterior, en donde la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico se selecciona del grupo que consiste en un solo aminoácido, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, y las secuencias de

aminoácidos de SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:58, y SEQ ID NO:69.

25. La proteína de fusión de acuerdo con el número 23 anterior, en donde la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico es la secuencia de aminoácidos en la cual 2 a 10 de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en un solo aminoácido, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, y SEQ ID NO:34, y las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 y SEQ ID NO:69, están enlazadas en tándem.

26. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 20 a 25 anteriores, en donde la proteína diferente (A) es una proteína de origen humano.

27. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 20 a 26 anteriores, en donde la proteína diferente (A) es una citocina, un factor de crecimiento o un medicamento de anticuerpo.

28. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 20 a 26 anteriores, en donde la proteína diferente (A) se selecciona del grupo que consiste en un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una enzima lisosomal, un factor neurotrófico ciliar (CNTF), un factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), una neurotrofina 3, una neurotrofina 4/5, una neurotrofina 6, una neuregulina 1, una eritropoyetina, una darbepoyetina, una activina, un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un interferón $\alpha$, un interferón $\beta$, un interferón $\gamma$, una interleucina 6, un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), un factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), un receptor del factor de necrosis tumoral -$\alpha$(receptor TNF-$\alpha$), un ligando PD-1, un PD-L1, un PD-L2, una enzima que tiene una actividad de degradación de beta-amiloide, un anticuerpo anti-beta-amiloide, un anticuerpo anti-BACE, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-TNF-$\alpha$, y un anticuerpo anti-CTLA-4.

29. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 20 a 26 anteriores, en donde la proteína diferente (A) es una enzima lisosomal, y la enzima lisosomal se selecciona del grupo que consiste en $\alpha$-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, $\alpha$-glucosidasa ácida, glucocerebrosidasa, $\beta$-galactosidasa, proteína activadora GM2, $\beta$-hexosaminidasa A, $\beta$-hexosaminidasa B, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, $\alpha$-manosidasa, $\beta$-manosidasa, galactosilceramidasa, saposina C, alilsulfatasa A, $\alpha$-L-fucosidasa, aspartilglucosaminidasa, $\alpha$-N-acetilgalactosaminidasa, esfingomielinasa ácida, $\alpha$-galactosidasa A, $\beta$-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.

30. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 20 a 29 anteriores, en donde la albúmina sérica está unida a la proteína de fusión.

31. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 20 a 29 anteriores, en donde una región Fc de IgG humana o una parte de la misma está unida a la proteína de fusión.

32. Un ácido nucleico que codifica el péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con cualquiera de los números 1 a 17 anteriores.

33. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 20 a 31 anteriores

34. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con los números 32 o 33 anteriores incorporado al mismo.

35. Una célula transformada con el vector de expresión de acuerdo con el número 34 anterior.

36. La célula de acuerdo con el número 35 anterior, en donde la célula se deriva de un mamífero.

37. Un péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano que comprende la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:55.

38. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 37 anterior, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o adicionados es de 1 a 5.

39. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 37 anterior, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o adicionados es de 1 a 3.

40. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 1 anterior, que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:55.

41. El péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 1 anterior, en donde el péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano se selecciona del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (6):

(1) la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:9, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11, y la

secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13;

(2) la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:15, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:17, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:19;

(3) la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:23, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25;

(4) la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:27, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30 o SEQ ID NO:31;

(5) la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:23, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25; y

(6) la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, en la cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56 o SEQ ID NO:57, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25.

42. El péptido humano de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 41 anterior, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos es de 85 % o superior.

43. El péptido humano de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo con el número 41 anterior, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos es de 90 % o superior.

44. El péptido humano de afinidad con el receptor de transferrina humano de acuerdo

con el número 41 anterior, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos es de 95 % o superior.

45. Un complejo anticuerpo-fármaco de cadena pesada, en donde un anticuerpo de cadena pesada dirigido a una molécula presente en la superficie de una célula endotelial vascular como antígeno está enlazado a un fármaco.

46. El complejo de acuerdo con el número 45 anterior, en donde el fármaco es cualquiera de una proteína diferente (A), un ácido nucleico o un compuesto de bajo peso molecular.

47. Una proteína de fusión que comprende:

un anticuerpo de cadena pesada dirigido a una molécula presente en la superficie de una célula endotelial vascular como antígeno; y

una proteína diferente (A),

en donde el anticuerpo de cadena pesada está unido al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un enlazador, o el anticuerpo de cadena pesada está unido al N-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un enlazador.

48. La proteína de fusión de acuerdo con el número 47 anterior, en donde el enlazador es un enlazador peptídico que consiste en 1 a 50 aminoácidos.

49. La proteína de fusión de acuerdo con el número 47 anterior, en donde la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico se selecciona del grupo que consiste en un solo aminoácido, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15, y la secuencia de aminoácidos que consiste en tres secuencias consecutivas de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.

50. La proteína de fusión de acuerdo con el número 47 anterior, en donde la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico es la secuencia de aminoácidos en la cual 2 a 10 de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en un solo aminoácido, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:12, y SEQ ID NO:13, y la secuencia de aminoácidos que consiste en tres secuencias consecutivas de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, están enlazadas en tándem.

51. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 46 a 50 anteriores, en donde la proteína diferente (A) es una proteína de origen humano.

52. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 46 a 51 anteriores, en donde la proteína diferente (A) es una citocina, un factor de crecimiento o un medicamento de anticuerpo.

53. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 46 a 51 anteriores, en donde la proteína diferente (A) se selecciona del grupo que consiste en un factor

neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una enzima lisosomal, un factor neurotrófico ciliar (CNTF), un factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), una neurotrofina 3, una neurotrofina 4/5, una neurotrofina 6, una neuregulina 1, una eritropoyetina, una darbepoyetina, una activina, un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un interferón α, un interferón β, un interferón γ, una interleucina 6, un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), un factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), un receptor del factor de necrosis tumoral -α(receptor TNF-α), un ligando PD-1, un PD-L1, un PD-L2, una enzima que tiene una actividad de degradación de beta-amiloide, un anticuerpo anti-beta-amiloide, un anticuerpo anti-BACE, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-TNF-α, y un anticuerpo anti-CTLA-4.

54. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 46 a 51 anteriores, en donde la proteína diferente (A) es una enzima lisosomal, y la enzima lisosomal se selecciona del grupo que consiste en α-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, α-glucosidasa ácida, glucocerebrosidasa,β-galactosidasa, proteína activadora GM2, β-hexosaminidasa A, β-hexosaminidasa B, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, α-manosidasa, β-manosidasa, galactosilceramidasa, saposina C, alilsulfatasa 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.

55. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 46 a 54 anteriores, en donde la albúmina sérica se une además a la proteína de fusión

56. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 46 a 54 anteriores, en donde una región Fc de IgG humana o una parte de la misma se une además a la proteína de fusión.

57. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 45 a 56 anteriores, en donde la célula endotelial vascular es una célula endotelial cerebrovascular.

58. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 45 a 57 anteriores, en donde la molécula presente en la superficie de la célula endotelial vascular es una molécula seleccionada del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor de leptina, un receptor de lipoproteína, un receptor IGF, OATP-F, un transportador aniónico orgánico, MCT-8, y un transportador de ácido monocarboxílico, y particularmente la molécula es una molécula de origen humano.

59. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 45 a 57 anteriores, en donde la molécula presente en la superficie de la célula endotelial vascular es un receptor de transferrina (TfR), y particularmente la molécula es un receptor de transferrina de origen humano.

60. El complejo de acuerdo con el número 45 o 46 anterior, en donde el fármaco está unido al anticuerpo de cadena pesada por medio de un enlazador seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, un polisacárido, dextrano, éter polivinílico, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, una quitina, ácido hialurónico, biotina-estreptavidina y derivados de los mismos El anticuerpo se une a la enzima lisosomal humana por medio de un enlazador seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, un polisacárido, dextrano, éter polivinílico, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, una quitina, ácido hialurónico, biotina-estreptavidina y derivados de los mismos.

61. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con los números 45 a 60 anteriores, en donde el anticuerpo de cadena pesada es la totalidad o una parte de un anticuerpo de cadena pesada derivado de un animal de la familia Camelidae o un receptor neoantígeno de inmunoglobulina derivado de peces cartilaginosos.

62. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con el número 61 anterior, en donde el anticuerpo de cadena pesada es un anticuerpo de cadena pesada simple.

63. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con el número 61 o 62 anterior, en donde el anticuerpo de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (4):

(1) un anticuerpo de cadena pesada compuesto únicamente por la totalidad o una parte de una región variable de la cadena pesada;

(2) un anticuerpo de cadena pesada compuesto por la totalidad o una parte de la región variable y una parte de una región bisagra de la cadena pesada;

(3) un anticuerpo de cadena pesada compuesto por la totalidad de la región variable y la región bisagra de la cadena pesada; y

(4) un anticuerpo de cadena pesada que incluye una parte de una región constante además de la región variable y la región bisagra de la cadena pesada.

64. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 47 a 59 y 61 a 63 anteriores.

65. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con el número 64 anterior incorporado al mismo.

66. Una célula transformada con el vector de expresión de acuerdo con el número 65 anterior.

67. La célula de acuerdo con el número 66 anterior, en donde la célula se deriva de un mamífero.

68. Una composición farmacéutica que comprende el complejo o la proteína de fusión de acuerdo con los números 45 a 63 anteriores como principio activo, en particular una composición farmacéutica en la cual el principio activo atraviesa la barrera hematoencefálica y ejerce eficacia farmacológica sobre los nervios centrales.

69. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano, el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, y que se selecciona del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (6):

(1) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:9, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO: 11, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13, donde cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 puede ser cualquier secuencia; sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, o la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13;

(2) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:15, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO: 17, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:19, donde cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 puede ser cualquier secuencia; sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18, o la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19;

(3) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 o SEQ ID

NO: 23, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25, donde cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 puede ser cualquier secuencia; sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24, o la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25;

(4) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:27, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO: 29, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30 o SEQ ID NO:31, donde cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 puede ser cualquier secuencia; sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, o la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31;

(5) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO: 23, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25, donde cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 puede ser cualquier secuencia; sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24, o la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25; y

(6) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56 o SEQ ID NO: 57, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24

o SEQ ID NO:25, donde cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 puede ser cualquier secuencia; sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24, o la secuencia de aminoácidos de CDR1 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, la secuencia de aminoácidos de CDR2 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25.

70. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano, el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, y que se selecciona del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (6):

(1) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada el cual contiene la secuencia de aminoácidos que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, y en el cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1, y CDR3 son como se muestra en la opción (1) del número 69 anterior;

(2) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada el cual contiene la secuencia de aminoácidos que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:4, y en el cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1, y CDR3 son como se muestra en la opción (2) del número 69 anterior;

(3) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada el cual contiene la secuencia de aminoácidos que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:5, y en el cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1, y CDR3 son como se muestra en la opción (3) del número 69 anterior;

(4) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada el cual contiene la secuencia de aminoácidos que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:6, y en el cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1, y CDR3 son como se muestra en la opción (4) del número 69 anterior;

(5) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada el cual contiene la secuencia de aminoácidos que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:7, y en el cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1, y CDR3 son como se muestra en la opción (5) del número 69 anterior; y

(6) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada el cual contiene la secuencia de aminoácidos que tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:8, y en el cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1, y CDR3 son como se muestra en la opción (6) del número 69 anterior.

71. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en números (1) a (6) del número 70 anterior, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos es de 85 % o superior.

72. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en números (1) a (6) del número 70 anterior, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos es de 90 % o superior.

73. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en números (1) a (6) del número 70 anterior, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos es de 95 % o superior.

74. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano, el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene tres regiones que determinan la complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, y que se selecciona del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (6):

(1) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, en la cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1 y CDR3 son como se muestra en la opción (1) del número 69 anterior;

(2) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:4, en la cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1 y CDR3 son como se muestra en la opción (2) del número 69 anterior;

(3) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:5, en la cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1 y CDR3 son como se muestra en la opción (3) del número 69 anterior;

(4) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:6, en la cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1 y CDR3 son como se muestra en la opción (4) del número 69 anterior;

(5) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:7, en la cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1 y CDR3 son como se muestra en la opción (5) del número 69 anterior;

(6) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en la cual se sustituyen, eliminan o adicionan de 1 a 10 aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:8, en la cual las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR1 y CDR3 son como se muestra en la opción (6) del número 69 anterior;

75. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en los números (1) a (6) del número 74 anterior, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o adicionados es de 1 a 5.

76. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en los números (1) a (6) del número 74 anterior, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o adicionados es de 1 a 3.

77. El péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con cualquiera de los números 69 a 76 anteriores, en donde el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada tiene afinidad tanto por una región extracelular del receptor de transferrina humano como por una región extracelular del receptor de transferrina de mono.

78. El péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el número 77 anterior, en donde una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humano es $5\times10^{-9}$ a $1\times10^{-7}$.

79. El péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el número 77 anterior, en donde una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humano es $8\times10^{-9}$ a $2\times10^{-8}$.

80. El péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el número 77 anterior, en donde cuando el valor de la constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humano se toma como 1, el valor de la constante de disociación con el receptor de transferrina de mono es de 0.5 a 2.5.

81. El péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el número 77 anterior, en donde cuando el valor de la constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humano se toma como 1, el valor de la constante de disociación con el receptor de transferrina de mono es de 0.7 a 1.2.

82. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en los siguientes números (1) a (3), en donde se enlaza una pluralidad del péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con los números 69 a 81 anteriores:

(1) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual 2 a 10 del péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con los números 41 a 53 anteriores están enlazados directamente o por medio de un enlazador;

(2) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual 2 a 3 del péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con los números 41 a 53 anteriores están enlazados directamente o por medio de un enlazador; y

(3) un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual 2 de los péptidos de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con los números 41 a 53 anteriores están enlazados directamente o por medio de un enlazador.

83. El péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el

número 82 anterior, en donde el enlazador para enlazar entre los péptidos de región variable de anticuerpo de cadena pesada es un enlazador peptídico que consiste en 1 a 50 aminoácidos.

84. El péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el número 83 anterior, en donde la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico para enlazar entre los péptidos de región variable de anticuerpo de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en un solo aminoácido, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:58 y SEQ ID NO:69.

85. Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual la secuencia de aminoácidos de un enlazador peptídico para enlazar entre los péptidos de región variable de anticuerpo de cadena pesada es la secuencia de aminoácidos en la cual 2 a 10 de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en un aminoácido simple, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:58, y SEQ ID NO:69, están enlazadas en tándem.

86. Un complejo péptido-fármaco de región variable de anticuerpo de cadena pesada en el cual un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada está enlazado a un fármaco, en donde el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada es el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con cualquiera de los números 69 a 85 anteriores.

87. El complejo de acuerdo con el número 86 anterior, en donde el fármaco es cualquiera de una proteína diferente (A), un ácido nucleico o un compuesto de bajo peso molecular.

88. Una proteína de fusión de un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada y una proteína diferente (A), en donde el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada es el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con cualquiera de los números 69 a 85 anteriores.

89. La proteína de fusión de acuerdo con el número 88 anterior, en donde el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada está unido al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un enlazador.

90. La proteína de fusión de acuerdo con el número 88 anterior, en donde el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada está unido al N-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un enlazador.

91. La proteína de fusión de acuerdo con los números 89 o 90 anteriores, en donde el enlazador es un enlazador peptídico que consiste en 1 a 50 aminoácidos.

92. La proteína de fusión de acuerdo con el número 91 anterior, en donde la secuencia

de aminoácidos del enlazador peptídico se selecciona del grupo que consiste en un solo aminoácido, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:58, y SEQ ID NO:69.

93. La proteína de fusión de acuerdo con el número 91 anterior, en donde la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico es la secuencia de aminoácidos en la cual 2 a 10 de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en un solo aminoácido, la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:58, y SEQ ID NO:69, están enlazadas en tándem.

94. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 87 a 93 anteriores, en donde la proteína diferente (A) es una proteína de origen humano.

95. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 87 a 94 anteriores, en donde la proteína diferente (A) es una citocina, un factor de crecimiento o un medicamento de anticuerpo.

96. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 87 a 94 anteriores, en donde la proteína diferente (A) se selecciona de entre las mostradas en el número 35 anterior.

97. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 87 a 94 anteriores, en donde la proteína diferente (A) es una enzima lisosomal, y la enzima lisosomal se selecciona de entre las mostradas en el número 36 anterior.

98. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 87 a 94 anteriores, en donde la albúmina sérica está unida al complejo o a la proteína de fusión.

99. El complejo o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 87 a 94 anteriores, en donde una región Fc de IgG humana o una parte de la misma está unida al complejo o a la proteína de fusión.

100. Un ácido nucleico que codifica el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con cualquiera de los números 69 a 85 anteriores.

101. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de los números 88 a 99 anteriores

102. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con los números 100 o 101 anteriores incorporado al mismo.

103. Una célula transformada con el vector de expresión de acuerdo con el número 102 anterior.

104. La célula de acuerdo con el número 103 anterior, en donde la célula se deriva de un

mamífero.

**Efectos ventajosos de la invención**

[0010] El péptido que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano (péptido de afinidad hTfR), el cual es una modalidad de la presente invención, es tal que cuando se une a una sustancia que difícilmente o en absoluto puede atravesar la barrera hematoencefálica, el péptido puede hacer que la sustancia atraviese la barrera hematoencefálica y alcance el sistema nervioso central, y por lo tanto, la función de la sustancia se puede exhibir en el sistema nervioso central.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011] La Figura 1 son fotografías de dibujo-sustitución que muestran los resultados de la tinción inmunohistoquímica para el anticuerpo anti-hTfR en cerebelo de ratón 6 horas después de la administración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab. Panel (a) muestra un resultado de la administración de trastuzumab, panel (b) muestra un resultado de la administración de péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1, panel (c) muestra un resultado de la administración de péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 2, panel (d) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 3, panel (e) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 4, y panel (f) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5. La barra en la esquina inferior derecha de cada fotografía indica un ancho de 50-μm.

La Figura 2 son fotografías de dibujo-sustitución que muestran los resultados de la tinción inmunohistoquímica para el anticuerpo anti-hTfR en cerebelo de ratón 24 horas después de la administración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab. El panel (a) muestra un resultado de la administración de trastuzumab, panel (b) muestra un resultado de la administración de péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1, panel (c) muestra un resultado de la administración de péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 2, panel (d) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 3 y panel (e) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 4. La barra en la esquina inferior derecha de cada fotografía indica un ancho de 50-μm.

La Figura 3 es una gráfica que muestra los valores cuantitativos de péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 y trastuzumab incluidos en diversos tejidos cerebrales de monos cynomolgus 8 horas después de la administración de estas sustancias. La gráfica muestra los valores cuantitativos de (1) corteza cerebral, (2) cerebelo, (3) hipocampo, (4) mesencéfalo, (5) puente de Varolio, (6) médula oblonga, (7) núcleo caudado, (8) putamen, (9) globo pálido, (10) tálamo, (11) hipotálamo, (12) médula espinal cervical, (13) médula espinal torácica, (14) médula espinal lumbar y (15) retina. El eje vertical representa las cantidades (μg) de estas sustancias incluidas por peso húmedo (g). Las barras sombreadas indican los valores cuantitativos de trastuzumab, y las barras negras indican los valores cuantitativos del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5.

La Figura 4 es una gráfica que muestra los valores cuantitativos de péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 y trastuzumab incluidos en varios órganos de monos cynomolgus 8 horas después de la administración de estas sustancias. La gráfica muestra los valores cuantitativos de (1) hígado, (2) riñón, (3) corazón (ventrículo izquierdo), (4) corazón (válvula aórtica), (5) pulmón, (6) médula ósea, (7) bazo, (8) timo, (9) testículo, (10) próstata, (11) músculo recto femoral, (12) EDL, (13) músculo sóleo, (14) tríceps y (15) diafragma. El eje vertical representa las cantidades (μg) de estas sustancias incluidas por peso húmedo (g). Las barras sombreadas indican los valores cuantitativos de trastuzumab, y las barras negras indican los valores cuantitativos del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5.

La Figura 5 es una gráfica que muestra los valores medidos de la concentración de heparán sulfato (HS) incluida en el líquido cefalorraquídeo (CSF, por sus siglas en inglés) de ratón después de la administración de una proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR y la iduronato-2-sulfatasa humana (hIDS). El eje vertical representa la concentración (μg/mL) de heparán sulfato (HS) incluido en el líquido cefalorraquídeo (CSF). Las barras verticales indican los valores de (desviación estándar).

La Figura 6 es una gráfica que muestra los valores medidos de la concentración de heparán sulfato (HS) incluida en el tejido cerebral de ratón después de la administración de una proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR y la iduronato-2-sulfatasa humana (hIDS). El eje vertical representa la concentración (μg/mg) de heparán sulfato (HS) incluida por peso seco (mg) del tejido cerebral. Las barras verticales indican los valores de (desviación estándar).

La Figura 7 es una gráfica que muestra los valores medidos de la concentración de heparán sulfato (HS) incluida en el líquido cefalorraquídeo ( CSF) y el tejido cerebral de ratones después de la administración de una proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR y la heparán-N-sulfatasa humana (hSGSH). El panel (a) muestra el valor medido de heparán sulfato (HS) incluido en el tejido cerebral, y panel (b) muestra el valor medido en el líquido cefalorraquídeo (CSF). En el panel (a), el eje vertical representa la concentración (μg/mg) de heparán sulfato (HS) incluido por peso seco (mg) del tejido cerebral, y las barras verticales indican los valores de. En el panel (b), el eje vertical representa la concentración (μg/mL) de heparán sulfato (HS) incluido en el líquido cefalorraquídeo (CSF), y las barras verticales indican los valores de DE.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0012] En muchos mamíferos, incluidos el humano y el ratón, los monómeros de anticuerpos se forman como heterotetrámeros en los cuales dos cadenas H y dos cadenas L están unidas covalentemente por enlaces disulfuro. En el extremo N-terminal de cada cadena, hay una región en la cual la secuencia de aminoácidos difiere entre los diferentes anticuerpos, y esta región se denomina región variable. En la región variable de la cadena H, hay tres regiones que determinan

la complementariedad y que contribuyen significativamente a la unión específica a antígenos. Estas tres regiones que determinan la complementariedad se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 en orden desde el N-terminal. Del mismo modo, en la cadena L también hay tres regiones que determinan la complementariedad que contribuyen significativamente a la unión específica a antígenos, y estas tres regiones que determinan la complementariedad se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 en orden desde el N-terminal.

[0013] Una cadena H y una cadena L forman un par y se unen específicamente a un antígeno. Es decir, la especificidad para un antígeno viene determinada aproximadamente por las secuencias de aminoácidos de un total de seis sitios de CDR, incluidos tres sitios de CDR en la cadena H y tres sitios de CDR en la cadena L. Dado que los monómeros de muchos anticuerpos de mamíferos tienen dos pares de una cadena H y una cadena L, una molécula de anticuerpo tiene dos sitios de una región que se puede unir a antígenos.

[0014] Las regiones distintas de la CDR en la región variable se denominan regiones marco (FR). Cada una de las cadenas H y L tiene cuatro sitios de FR, y se denominan como FR1, FR2, FR3 y FR4 en orden desde el N-terminal. Una CDR se intercala entre FR en la región variable.

[0015] FR1 es una región que se extiende desde el N-terminal de la región variable del anticuerpo de cadena pesada hasta el aminoácido adyacente al N-terminal de CDR1. FR2 es una región entre CDR1 y CDR2. FR3 es una región entre CDR2 y CDR3. FR4 es una región que se extiende desde el aminoácido adyacente al C-terminal de CDR3 hasta el C-terminal de la región variable del anticuerpo de cadena pesada.

[0016] A diferencia de los monómeros descritos anteriormente de muchos anticuerpos de mamíferos, existen anticuerpos que contienen únicamente cadenas pesadas sin cadenas L (anticuerpos de cadena pesada). Ejemplos de ello incluyen un anticuerpo de cadena pesada (hcIg) producido por los animales caméllidos, y un nuevo receptor de antígeno inmunoglobulina (IgNAR) producido por muchos peces cartilaginosos, incluyendo tiburones. El anticuerpo de cadena pesada (hcIg) de los animales camélidos es un homodímero en el cual dos cadenas pesadas están unidas covalentemente por enlaces disulfuro. Cada una de las cadenas pesadas tiene una región variable en N-terminal, y en esta región variable, hay tres sitios de la región que determina la complementariedad (CDR) que contribuyen significativamente a la unión específica a antígenos. Estos tres sitios de la región que determina la complementariedad se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 en orden desde el extremo N-terminal. Dado que cada cadena pesada que constituye la hcIg se puede unir específicamente a un antígeno incluso en forma monomérica, una hcIg tiene dos sitios de la región que se pueden unir a un antígeno en la molécula.

[0017] Del mismo modo que la hcIg, la IgNAR también es un homodímero en el cual dos cadenas pesadas están unidas covalentemente por enlaces disulfuro. Cada una de las cadenas pesadas tiene una región variable en N-terminal, y esta región variable tiene tres sitios de la región que determina la complementariedad (CDR) que contribuye significativamente a la unión específica

a un antígeno. Estos tres sitios de la región que determina la complementariedad se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 en orden desde el extremo N-terminal. Dado que cada cadena pesada que constituye la IgNAR se puede unir específicamente a un antígeno incluso en forma monomérica, una IgNAR tiene dos sitios de la región que se pueden unir a un antígeno en la molécula.

[0018] La región marco en la región variable de la hclg y la IgNAR se puede identificar de bases de datos públicas de ADN y similares que incluyan secuencias genéticas de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal y las secuencias de aminoácidos de los genes de la región variable de la cadena pesada humana se pueden seleccionar de la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en www.mrccpe.cam.ac.uk/vbase). Las secuencias de ADN y las secuencias de aminoácidos de la línea germinal también se pueden identificar de secuencias de ADN y secuencias de aminoácidos descritas en otras publicaciones, por ejemplo, "Kabat EA, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)", "Tomlinson IM, J. fol. Biol. 227, 776-98 (1992)", and "Cox JPL, Eur. J. Immunol. 24:827-836 (1994)". Por ejemplo, dado que el gen de la región variable de la cadena pesada humana es homólogo a la región variable de la hclg, también es posible identificar la región marco de la hclg con base en la información sobre el gen de la región variable de la cadena pesada humana.

[0019] Sin embargo, sin estar limitado a ello, para cada región FR, (1) una región que contiene de 1 a 5 aminoácidos desde el N-terminal de la misma y/o de 1 a 5 aminoácidos en el C-terminal, (2) una región que contiene de 1 a 3 aminoácidos desde el N-terminal de la misma y/o de 1 a 3 aminoácidos en el C-terminal, o (3) una región que incluye 1 o 2 aminoácidos desde el N-terminal de la misma y/o 1 o 2 aminoácidos en el C-terminal, se puede incluir en la región CDR sin estar incluida en la región FR. Incluso cuando una región se considera generalmente como FR, la región se puede incluir en la CDR en la presente invención siempre que la región esté implicada en el mantenimiento de la estructura de la CDR o la unión a un antígeno y tenga una función de determinar sustancialmente la complementariedad del anticuerpo.

[0020] En C-terminal de la región variable del anticuerpo de cadena pesada, se ubica una región constante, con una región bisagra interpuesta entre ambas. También se ubica una región constante en C-terminal de la región variable de la IgNAR. Estas regiones constantes casi no contribuyen a la unión específica del anticuerpo de cadena pesada a los antígenos.

[0021] El anticuerpo de cadena pesada es un homodímero unido covalentemente por enlaces disulfuro en la región bisagra. Sin embargo, el anticuerpo de cadena pesada no tiene que ser un homodímero para unirse a un antígeno, y cada una de las cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de cadena pesada se puede unir a un antígeno por sí misma.

[0022] Un monómero de la cadena pesada que constituye el anticuerpo de cadena pesada puede obtenerse eliminando residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, o sustituyendo los residuos de cisteína por otros aminoácidos.

Tal monómero de la cadena pesada se puede producir como proteína recombinante utilizando una tecnología de ingeniería genética. En la presente memoria descriptiva, tal cadena pesada se denomina "anticuerpo de cadena pesada simple". Un anticuerpo de cadena pesada simple se incluye en el anticuerpo de cadena pesada siempre que pueda unirse al antígeno del anticuerpo de cadena pesada del cual se derivó el anticuerpo de cadena pesada simple. Los anticuerpos de cadena pesada simple se pueden conectar en tándem. Cada uno de los anticuerpos de cadena pesada simple se enlaza mediante el enlace del C-terminal de uno con el N-terminal de otro, directamente o por medio de un enlazador peptídico. El número de anticuerpos de cadena pesada simples a conectar es de 2 a 10, y el número es, por ejemplo, 2. Con respecto a la secuencia del enlazador peptídico, se pueden aplicar las descritas en la presente memoria descriptiva. Un anticuerpo obtenido por conexión de una pluralidad de tales anticuerpos de cadena pesada simple también se incluye en el anticuerpo de cadena pesada simple.

[0023] La región variable de cada una de las cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de cadena pesada se puede unir a un antígeno incluso en ausencia de una región bisagra o/y una región constante. Una proteína compuesta por tal región variable se puede producir como proteína recombinante, por ejemplo, construyendo un gen que codifique sólo la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada, incorporando este gen a un vector de expresión, e introduciendo el vector de expresión en una célula huésped.

[0024] En la presente memoria descriptiva, por comodidad, todos los anticuerpos que contienen una parte o la totalidad de la región variable de la cadena pesada que constituye un anticuerpo de cadena pesada y tienen afinidad por antígenos se consideran incluidos en el anticuerpo de cadena pesada. Además, cualquier anticuerpo que incluya: (1) una parte o la totalidad de la región bisagra, y (2) la región bisagra así como una parte de la región constante de la cadena pesada, además de una parte o la totalidad de la región variable de las cadenas pesadas que constituyen un anticuerpo de cadena pesada, también está incluida en el anticuerpo de cadena pesada. Los anticuerpos de cadena pesada incluyen los derivados de hclg y los derivados de IgNAR.

[0025] Las cadenas pesadas derivadas de la hclg incluyen: (1h) aquellos compuestos únicamente por la totalidad o una parte de la región variable de la cadena pesada, (2h) aquellos compuestos por la totalidad o una parte de la región variable y una parte de la región bisagra de la cadena pesada, (3h) aquellos compuestos por la totalidad de la región variable y la región bisagra de la cadena pesada, y (4h) aquellos que incluyen una parte de la región constante además de la región variable y la región bisagra de la cadena pesada. Aquí, una parte de la región constante incluida en el anticuerpo de cadena pesada es, por ejemplo, una parte correspondiente a una parte o a la totalidad de $C_H2$ de la cadena pesada. Los anticuerpos de cadena pesada derivados de IgNAR incluyen: (1I) aquellos compuestos únicamente por la totalidad o una parte de la región variable de la cadena pesada, (2I) aquellos compuestos por la región variable y una parte de la región bisagra

de la cadena pesada, (3l) aquellos compuestos por la totalidad de la región variable y la región bisagra de la cadena pesada, y (4l) aquellos que incluyen una parte de la región constante además de la región variable y la región bisagra de la cadena pesada. Aquí, una parte de la región constante incluida en el anticuerpo de cadena pesada es, por ejemplo, una parte correspondiente a una parte o a la totalidad de $C_H1$ de la cadena pesada. En la presente memoria descriptiva, las proteínas de (1h) a (4h) que contienen la región variable del anticuerpo de cadena pesada derivado de hcIg, y las proteínas de (1l) a (4l) que contienen la región variable del anticuerpo de cadena pesada derivado de IgNAR se denominan colectivamente péptidos de región variable de anticuerpo de cadena pesada. Por lo tanto, el péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada incluye aquellos que tienen dos sitios de unión al antígeno en los cuales dos cadenas peptídicas están unidas por enlaces disulfuro, y aquellos que tienen un sitio de unión al antígeno compuesto por una cadena peptídica.

[0026] En la presente memoria descriptiva, el anticuerpo de cadena pesada reconoce como antígeno una molécula presente en la superficie de una célula endotelial vascular, en particular una célula endotelial cerebrovascular. No existe ninguna limitación particular en cuanto a la especie de la célula endotelial vascular y de la célula endotelial cerebrovascular; sin embargo, se prefieren las células humanas. La molécula presente en la superficie de estas células es preferiblemente el receptor de transferrina (TfR), el receptor de insulina (IR), el receptor de leptina, un receptor de lipoproteínas, un receptor IGF, OATP-F, un transportador de aniones orgánicos, MCT-8, o un transportador de monocarboxilato; más preferiblemente TfR o el receptor de insulina; y aún más preferiblemente TfR.

[0027] Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada con afinidad por una molécula presente en la superficie de una célula endotelial vascular, en particular una célula endotelial cerebrovascular, se denomina péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de barrera hematoencefálica (péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada BBB). Además, el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada BBB y todos los péptidos que tienen afinidad por moléculas presentes en la superficie de las células endoteliales vasculares, siendo los péptidos derivados del péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada BBB, se denominan péptidos de afinidad BBB. En la presente memoria descriptiva, la proteína de las descritas anteriormente (1h) o (2h) que contiene la región variable de un anticuerpo de cadena pesada derivado de hcIg se denomina péptido de dominio variable único de inmunoglobulina. El péptido de dominio variable único de inmunoglobulina incluido en el péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada BBB se puede denominar particularmente péptido de dominio variable único de inmunoglobulina BBB. En la presente invención, cada uno de los términos VHH, dominio VHH, anticuerpo VHH, NANOBODY (marca comercial de Ablynx N.V.) y NANOBODY (marca comercial de Ablynx N.V.) tiene el mismo significado que el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina y se utilizan indistintamente. Por lo tanto, por ejemplo, el VHH que tiene afinidad

por el TfR está incluido en el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina BBB.

Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene afinidad por anti-hTfR se denomina péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR. Además, el péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR, y todos los péptidos que tienen afinidad por el anti-hTfR, que se derivan del péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR, se denominan péptidos de afinidad hTfR. Un VHH que tiene afinidad por hTfR está particularmente incluido en el péptido de afinidad hTfR. Lo mismo aplica con otros VHH que tienen afinidad por las moléculas presentes en la superficie de las células y, por ejemplo, en el péptido de afinidad hIR se incluye un VHH que tiene afinidad por hIR. No hay ninguna limitación particular sobre el número de aminoácidos que constituyen un péptido de afinidad BBB; sin embargo, el péptido de afinidad BBB es generalmente un péptido compuesto de 80 a 200 aminoácidos, preferiblemente de 80 a 150 aminoácidos, más preferiblemente de 100 a 130 aminoácidos, y aún más preferiblemente de 110 a 125 aminoácidos. Por ejemplo, un péptido de afinidad BBB está compuesto por 113, 115, 119 o 120 aminoácidos. En la presente memoria descriptiva, el término "péptido" tiene el mismo significado que "polipéptido" o "proteína", y puede sustituirse por estos términos. En la siguiente memoria descriptiva, se tomará como ejemplo un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano (hTfR), y se describirán en detalle sus características y similares; sin embargo, estas memorias descriptivas también se pueden aplicar en general a otros péptidos de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tienen afinidad por moléculas presentes en la superficie de las células.

[0028] Mientras que un anticuerpo se compone normalmente de cadenas ligeras y cadenas pesadas, un VHH se compone de una sola cadena pesada, y por lo tanto, el proceso en el caso de producir una proteína de fusión en la cual el VHH se une a una proteína diferente (A) como un péptido de afinidad hTfR se puede simplificar. Por ejemplo, en el caso de que se utilice un anticuerpo convencional como péptido de afinidad del hTfR, es necesario expresar dos proteínas; sin embargo, cuando se utiliza un VHH, basta con expresar una proteína.

[0029] Un péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano se denomina particularmente péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR. En la presente memoria descriptiva, la proteína descrita anteriormente de (1h) o (2h) que contiene una región variable de anticuerpo de cadena pesada derivada de hclg se denomina péptido de dominio variable único de inmunoglobulina. Un péptido de inmunoglobulina de dominio variable único que tiene afinidad por el receptor de transferrina humano (hTfR) se denomina particularmente péptido de dominio variable único de inmunoglobulina hTfR o péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano (péptido de afinidad hTfR). El péptido de afinidad hTfR es un péptido compuesto preferiblemente de 100 a 130 aminoácidos, y más preferiblemente de 110 a 125 aminoácidos. Por ejemplo, el péptido de afinidad hTfR está compuesto por 113, 115 o 119 aminoácidos.

[0030] Además de los péptidos descritos como (1h) a (4h) y (1l) a (4l), los péptidos de región variable de anticuerpos de cadena pesada también incluyen péptidos en los cuales se han aplicado mutaciones tales como sustitución, deleción y adición a los péptidos descritos anteriormente, siempre que los péptidos tengan afinidad por los antígenos por los cuales los péptidos originales tienen afinidad. Por otra parte, además del péptido descrito como (1h) o (2h), los péptidos de dominio variable único de inmunoglobulina también incluyen péptidos en los cuales se han aplicado mutaciones tales como sustitución, deleción y adición al péptido descrito anteriormente, siempre y cuando el péptido tenga afinidad por el antígeno por el cual el péptido original tiene afinidad. Las mutaciones de los péptidos del dominio variable único de inmunoglobulina hTfR se describirán con más detalle a continuación.

[0031] De acuerdo con la presente invención, el término "receptor de transferrina humano" o "hTfR" se refiere a una proteína de membrana que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:1. De acuerdo con una modalidad, el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención se une específicamente a una parte de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:1, la parte que incluye desde el residuo de cisteína 89 desde el N-terminal hasta la fenilalanina en el C-terminal (región extracelular de hTfR); sin embargo, la modalidad no se limita a esto. Además, el término "receptor de transferrina de mono" o "TfR de mono" de acuerdo con la presente invención se refiere particularmente a una proteína de membrana que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:2 derivada del mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*). De acuerdo con una modalidad, el anticuerpo anti-hTfR de la presente invención también se une a una parte de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:2, la parte que incluye desde el residuo de cisteína 89 desde el N-terminal hasta la fenilalanina en el C-terminal (región extracelular de TfR de mono); sin embargo, la modalidad no se limita a esto.

[0032] El péptido de afinidad hTfR también se puede obtener como proteína recombinante por una técnica similar.

(1a) Se produce un receptor de transferrina humano recombinante (rhTfR) utilizando células en las cuales se ha introducido un vector de expresión que incorpora el gen hTfR.

(2a) Los animales camélidos capaces de producir hcIg, o los peces, en particular los peces cartilaginosos, capaces de producir IgNAR tales como el tiburón, se inmunizan utilizando rhTfR.

(3a) Se extraen células productoras de anticuerpos de los organismos inmunizados utilizando rhTfR. Aquí, dado que las células productoras de anticuerpos están presentes particularmente en sangre periférica, médula ósea, bazo y similares, se recolectan como células productoras de anticuerpos células de sangre periférica, células derivadas de médula ósea, células de bazo y similares.

(4a) El ADNc se sintetiza del ARNm extraído de las células productoras de anticuerpos por una reacción de transcripción inversa.

(5a) Se realiza una reacción de PCR utilizando ADNc como molde, y se amplifica un

fragmento de ADN que contiene un gen que codifica una región variable de un anticuerpo de cadena pesada.

(6a) El fragmento de ADN que codifica una región variable de un anticuerpo de cadena pesada se incorpora a un vector de expresión, y las células huésped se transforman utilizando este vector de expresión para obtener células que expresen la región variable de un anticuerpo de cadena pesada.

(7a) De las células que expresan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada, se seleccionan las células que expresan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que reconoce el hTfR (células que expresan la región variable del anti-hTfR de cadena pesada). También es posible que, de las células aquí seleccionadas, se amplifique el gen que codifica la región variable de un anticuerpo de cadena pesada el cual reconoce el hTfR mediante la realización de una reacción PCR y se aísle.

(8a) Las células que expresan la región variable del anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada se cultivan para expresar un péptido de región variable de anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada recombinante en el fluido de cultivo o en las células.

(9a) Se purifica el péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR recombinante expresado.

[0033] Las células que expresan la región variable del anticuerpo de cadena pesada obtenido en el paso descrito anteriormente (6a) para adquirir un anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR el cual reconoce hTfR, no expresan necesariamente la región variable del anticuerpo de cadena pesada el cual reconoce hTfR. Por lo tanto, se requiere un paso de selección de células que produzcan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que tenga las características deseadas (afinidad por hTfR) de las células que expresan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada obtenido en el paso descrito anteriormente (6a), es decir, el paso descrito anteriormente (7a). Como método para seleccionar células que producen un péptido de región variable de anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada, es eficaz el método que se describirá en detalle a continuación.

[0034] Las células que expresan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada obtenidas en la etapa descrita anteriormente (6a) se siembran y cultivan en una placa de 96 pocillos de manera que aproximadamente un pocillo contiene una célula, y luego se recolecta el sobrenadante de cultivo de cada pocillo. El hTfR recombinante se adiciona a la placa y se retiene en ella, posteriormente se adiciona el sobrenadante de cultivo recolectado, y la región variable del anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada contenido en el sobrenadante de cultivo se deja unir al hTfR recombinante. A continuación, se retira de la placa el sobrenadante del cultivo y se vuelve a lavar la placa para eliminar cualquier anticuerpo que no esté unido al hTfR recombinante. A continuación, se mide la cantidad de anticuerpos retenidos en la placa. De acuerdo con este método, como la afinidad por el hTfR del anticuerpo contenido en el sobrenadante de cultivo de las células productoras de

anticuerpos adicionadas en la placa es superior, la cantidad de anticuerpos retenidos en la placa se hace mayor. Por lo tanto, se mide la cantidad de anticuerpos retenidos en la placa, y las células correspondientes a la placa en la cual se retienen más anticuerpos se pueden seleccionar como la línea celular que produce el péptido de la región variable del anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada que tiene una afinidad relativamente superior por hTfR. También es posible realizar una reacción de PCR utilizando como molde el ADNc obtenido por transcripción inversa del ARNm extraído de la línea celular seleccionada de esta manera, y amplificar y aislar un fragmento de ADN que contiene un gen que codifica el péptido de la región variable del anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada.

[0035] Como otro método para obtener el anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR como proteína recombinante, se dispone de un método que incluye el siguiente paso. Este método incluye un paso de visualización de la región variable de un anticuerpo de cadena pesada codificado por un gen que codifica la región variable de un anticuerpo de cadena pesada en fagos, y la selección de los fagos que visualizan la región variable del anticuerpo de cadena pesada que tiene propiedades deseadas. Tal proceso se denomina método de visualización de fagos y es una tecnología conocida descrita en publicaciones internacionales del PCT (WO 1997/09436 y WO 1995/11317) y similares. Un método de aplicación del método de visualización de fagos para obtener un anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR que reconozca hTfR como proteína recombinante incluye, por ejemplo, los siguientes pasos (1b) a (9b). También se puede obtener un péptido de afinidad hTfR como proteína recombinante por una técnica similar.

(1b) Se produce un receptor de transferrina humano recombinante (rhTfR) utilizando células en las cuales se ha introducido un vector de expresión que incorpora el gen hTfR.

(2b) Los animales camélidos capaces de producir hcIg, o los peces, en particular los peces cartilaginosos, capaces de producir IgNAR tales como el tiburón, se inmunizan utilizando rhTfR.

(3b) Se extraen células productoras de anticuerpos de los organismos inmunizados utilizando el rhTfR. Aquí, dado que las células productoras de anticuerpos están presentes particularmente en sangre periférica, médula ósea, bazo y similares, se recolectan como células productoras de anticuerpos células de sangre periférica, células derivadas de médula ósea, células de bazo y similares.

(4b) El ADNc se sintetiza del ARNm extraído de las células productoras de anticuerpos por una reacción de transcripción inversa.

(5b) Se realiza una reacción de PCR utilizando ADNc como molde, y se amplifica un fragmento de ADN que contiene un gen que codifica una región variable de un anticuerpo de cadena pesada.

(6b) El fragmento de ADN que codifica una región variable de un anticuerpo de cadena pesada se incorpora a un fagémido, este fagémido se introduce en células huésped y, a continuación, las células huésped se cultivan para liberar en el medio de cultivo fagos que tienen la región variable del anticuerpo de cadena pesada en la superficie de la cápside.

(7b) Una solución que contiene los fagos recolectados se carga en una columna empaquetada con un portador que retiene el rhTfR, y se permite que los fagos que tienen la región variable de un anticuerpo de cadena pesada con afinidad por el rhTfR en la superficie de la cápside se unan a la columna. Después de lavar la columna, los fagos unidos al hTfR se eluyen de la columna. Alternativamente, la solución que contiene los fagos recolectados se adiciona a una placa que retiene el rhTfR, y se permite que los fagos que tienen la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que tiene afinidad por el rhTfR en la superficie de la cápside se unan a la placa.

(8b) Sólo se recolectan los fagos que visualizan la región variable del anticuerpo de cadena pesada el cual reconoce el hTfR retenido en la columna o placa, y se amplifica un gen que codifica la región variable del anticuerpo de cadena pesada el cual reconoce el hTfR por una reacción PCR utilizando el fagémido contenido en estos fagos como molde.

(9b) El gen amplificado se incorpora a un vector de expresión, y las células huésped se transforman utilizando este vector de expresión para obtener células que expresen la región variable del anticuerpo de cadena pesada que reconoce el hTfR.

(10b) Las células que expresan el péptido de región variable del anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada se cultivan para permitir que las células expresen un péptido de región variable del anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada recombinante en el fluido de cultivo o en las células.

(11b) Se purifica el péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR recombinante expresado.

[0036] En los pasos descritos anteriormente (1b) a (3b) del método de visualización de fagos, es necesario extraer células productoras de anticuerpos de un organismo inmunizado con rhTfR. En lugar de esto, se puede agrupar ARNm obtenido previamente de células productoras de anticuerpos de un organismo capaz de expresar un anticuerpo de cadena pesada, o un fragmento de ADN sintetizado utilizando este ARNm como molde, y se puede amplificar un fragmento de ADN que contiene un gen que codifica la región variable de un anticuerpo de cadena pesada utilizando el ARNm o fragmento de ADN descrito anteriormente como molde. De acuerdo con el método de visualización de fagos, por ejemplo, dado que se pueden cribar $1\times10^{10}$ fagos a la vez, existe la posibilidad de que los fagos que visualizan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que reconoce el hTfR se puedan seleccionar incluso a de células no inmunizadas. En este caso, no es necesario inmunizar a un organismo ni es necesario extraer del organismo células productoras de anticuerpos.

[0037] El paso descrito anteriormente (7b) está destinado a seleccionar fagos que visualicen la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que reconozca el rhTfR. Aquí, la afinidad de los fagos seleccionados por el rhTfR se puede ajustar mediante el ajuste de las condiciones para hacer que los fagos se unan a la columna (o placa), y/o las condiciones de lavado de la columna (o placa). Además, al llevar a cabo repetidamente el paso (7b) mientras se hacen las condiciones cada vez más rigurosas, los fagos que tienen una mayor afinidad por el rhTfR se

seleccionan cada vez que se repite el paso, y por lo tanto, sólo los fagos que visualizan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que tiene alta afinidad por el rhTfR se pueden adquirir eficientemente.

[0038] Además, durante el proceso en el cual se replica el genoma del fago, se pueden introducir mutaciones en el genoma. Dado que esto cambia la afinidad por el rhTfR de la región variable del anticuerpo de cadena pesada codificado por el genoma del fago, cuando el paso descrito anteriormente (7) se lleva a cabo repetidamente, existe la posibilidad de que se introduzcan mutaciones aleatoriamente en el genoma y se obtenga un anticuerpo que tiene una mayor afinidad por el rhTfR.

[0039] El proceso en el caso de repetir el paso descrito anteriormente (7b) es, por ejemplo, como se muestra en el siguiente número (7b').

(7b') Un fluido de cultivo que contiene fagos recolectados se carga en una columna empaquetada con un portador que retiene rhTfR, y se permite que los fagos que visualizan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que reconoce rhTfR se unan a la columna. Alternativamente, la solución que contiene los fagos recolectados se aplica sobre una placa que retiene rhTfR, y se permite que los fagos que tienen la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que tiene afinidad por rhTfR en la superficie de la cápside se unan a la placa. Después de lavar la columna o placa, los fagos que visualizan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que reconoce el hTfR se eluyen de la columna o placa. Los fagos eluidos se utilizan para infectar células huésped, posteriormente se cultivan las células huésped y se recolectan los fagos que visualizan la región variable del anticuerpo de cadena pesada en la superficie en el fluido de cultivo. Este fluido de cultivo que contiene los fagos recolectados se carga en un cromatógrafo de columna empaquetado con un portador que retiene rhTfR, o se adiciona sobre una placa que retiene rhTfR.

[0040] En el paso descrito anteriormente (7b'), se puede introducir activamente una mutación en el genoma del fago poniendo los fagos en contacto con un mutágeno, o adicionando un mutágeno en el fluido de cultivo de las células huésped infectadas con los fagos. Se puede introducir activamente una mutación en el genoma del fago irradiando los fagos o las células huésped infectadas con los fagos, con ondas electromagnéticas tales como radiación ultravioleta o rayos gamma.

[0041] Todas los pasos descritos anteriormente (1a) a (9a) y los pasos descritos anteriormente (1b) a (11b) pueden incluir un paso de aislamiento de un gen que codifica la región variable de un anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR. También es posible traducir la secuencia de aminoácidos que contiene la región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR de la secuencia de nucleótidos del gen aislado que codifica el anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR, y sintetizar artificialmente un fragmento de ADN que codifica esta secuencia de aminoácidos. Cuando se sintetiza artificialmente un fragmento de ADN, es posible sintetizarlo seleccionando los codones

adecuados para expresar el gen en las células huésped. Introduciendo un vector de expresión que incorpore tal fragmento de ADN en las células huésped, se puede aumentar el nivel de expresión del péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR en las células huésped. El nivel de expresión del péptido de afinidad rhTfR también se puede aumentar de la misma manera.

[0042] Además, las células utilizadas como células huésped en los pasos descritos anteriormente no están particularmente limitadas independientemente de que sean células procariotas o eucariotas, siempre que sean células capaces de expresar un péptido que contiene la región variable de un anticuerpo de cadena pesada introduciendo en las células un vector de expresión en el cual se ha incorporado un gen que codifica la región variable de un anticuerpo de cadena pesada; sin embargo, se prefieren particularmente *Escherichia coli*, células CHO derivadas de ovario de hámster chino o células NS/0 derivadas de mieloma de ratón. Además, con respecto al vector de expresión utilizado para incorporar y expresar un gen que codifica la región variable de un anticuerpo de cadena pesada, se puede utilizar sin limitación particular cualquier vector de expresión capaz de expresar un péptido que contiene la región variable del anticuerpo de cadena pesada cuando se introduce en células huésped. El gen incorporado al vector de expresión se dispone de forma descendente de una secuencia de ADN capaz de regular la frecuencia de transcripción del gen (sitio de control de la expresión génica) en una célula huésped. Ejemplos de un sitio de control de la expresión génica que se puede utilizar en la presente invención incluyen un promotor derivado del citomegalovirus, el promotor temprano del SV40, el promotor del factor de elongación 1$\alpha$ (EF-1$\alpha$) humano y el promotor de la ubiquitina C humana.

[0043] La secuencia de aminoácidos de la región variable en el péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR obtenido por los pasos descritos anteriormente incluye cuatro FR y tres CDR, tales como, desde el N-terminal, las secuencias de aminoácidos de FR1, CDR1, FR2, CDR1, FR3, CDR1, y FR4. Sin embargo, sin limitarse a esto, siempre que la secuencia de aminoácidos pueda unirse específicamente al hTfR, la secuencia de aminoácidos de la región variable puede ser una en la cual se elimine una parte o la totalidad de FR1, una en la cual se elimine una parte o la totalidad de FR4, o una en la cual se elimine una parte o la totalidad de FR1, y una parte o la totalidad de FR4. Estos péptidos en los cuales se eliminan partes de las regiones FR, también se incluyen en las regiones variables de los anticuerpos de cadena pesada anti-hTfR. Lo mismo aplica a los péptidos de afinidad hTfR.

[0044] Los péptidos de región variable de anticuerpos de cadena pesada anti-hTfR adecuados de acuerdo con una modalidad de la presente invención son péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de péptidos de afinidad hTfR 1 a 5. Los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 tienen secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 y 55, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 y 55 son todas secuencias de aminoácidos de la región variable. Los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 contienen las secuencias de aminoácidos de cuatro FR y tres CDR, tales como FR1, CDR1, FR2, CDR1, FR3, CDR1, y FR4,

en orden desde el N-terminal. Los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 están todos incluidos en los péptidos de afinidad hTfR.

[0045] CDR1 del péptido de afinidad hTfR 1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o 9, CDR2 del mismo es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 u 11, y CDR3 del mismo es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 o 13. En el péptido de afinidad hTfR 1, la secuencia de aminoácidos de cada una de las CDR se puede combinar arbitrariamente. Por ejemplo, el péptido de afinidad hTfR 1 es tal que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o de tal manera que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13. Además, cualquiera de las CDR puede consistir en estas secuencias de aminoácidos.

[0046] CDR1 del péptido de afinidad hTfR 2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14 o 15, CDR2 de la misma es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16 u 17, y CDR3 del mismo es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 o 19. En el péptido de afinidad hTfR 2, la secuencia de aminoácidos de cada CDR se puede combinar arbitrariamente. Por ejemplo, el péptido de afinidad hTfR 2 es tal que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, o de tal manera que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19. Además, cualquiera de las CDR puede consistir en estas secuencias de aminoácidos.

[0047] CDR1 del péptido de afinidad hTfR 3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o 21, CDR2 de la misma es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 u 23, y CDR3 del mismo es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o 25. En el péptido de afinidad hTfR 3, la secuencia de aminoácidos de cada una de las CDR se puede combinar arbitrariamente. Por ejemplo, el péptido de afinidad hTfR 3 es tal que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, o de tal manera que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25. Además, cualquiera de las CDR puede consistir en estas secuencias de

aminoácidos.

[0048] CDR1 del péptido de afinidad hTfR 4 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 o 27, CDR2 de la misma es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 u 29, y CDR3 del mismo es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30 o 31. En el péptido de afinidad hTfR 4, la secuencia de aminoácidos de cada una de las CDR se puede combinar arbitrariamente. Por ejemplo, el péptido de afinidad hTfR 4 es tal que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, o de tal manera que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31. Además, cualquiera de las CDR puede consistir en estas secuencias de aminoácidos.

[0049] CDR1 del péptido de afinidad hTfR 5 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o 21, CDR2 de la misma es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 u 23, y CDR3 del mismo es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o 25. En el péptido de afinidad hTfR 5, la secuencia de aminoácidos de cada una de las CDR se puede combinar arbitrariamente. Por ejemplo, el péptido de afinidad hTfR 5 es tal que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, o de tal manera que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25. Además, cualquiera de las CDR puede consistir en estas secuencias de aminoácidos.

[0050] CDR1 del péptido de afinidad hTfR 6 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o 21, CDR2 de la misma es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56 u 57, y CDR3 del mismo es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o 25. En el péptido de afinidad hTfR 6, la secuencia de aminoácidos de cada una de las CDR se puede combinar arbitrariamente. Por ejemplo, el péptido de afinidad hTfR 6 es tal que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, o de tal manera que CDR1 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, CDR2 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57, y CDR3 es una región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25. Además, cualquiera de las CDR puede consistir en estas secuencias de aminoácidos.

[0051] Además, la secuencia de aminoácidos de la región variable del péptido de afinidad hTfR descrito anteriormente puede tener una mutación aplicada a la misma, siempre que la región variable se pueda unir específicamente al hTfR En un caso donde se aplica tal mutación, la secuencia de aminoácidos de la región variable del péptido de afinidad hTfR después de introducir la mutación preferiblemente tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o superior, más preferiblemente la identidad de secuencia de aminoácidos de 85 % o superior, aún más preferiblemente la identidad de secuencia de aminoácidos de 90 % o superior, y aún más preferiblemente la identidad de secuencia de aminoácidos de 95 % o superior, y tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, 98 % o superior a la secuencia de aminoácidos original.

[0052] Además, cuando se aplica la mutación a la secuencia de aminoácidos de la región variable, la mutación se puede aplicar solamente a la región FR sin tener que aplicar la mutación a las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3. Cuando se aplica tal mutación, la secuencia de aminoácidos de la región variable después de introducir la mutación preferiblemente tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 85 % o superior, más preferiblemente la identidad de secuencia de aminoácidos de 90 % o superior, y aún más preferiblemente la identidad de secuencia de aminoácidos de 95 % o superior, y tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, 98 % o superior a la secuencia de aminoácidos original. Además, cuando se aplica la mutación a la secuencia de aminoácidos de la región variable, la mutación se puede aplicar solamente a las regiones CDR sin tener que aplicar la mutación a la secuencia de aminoácidos de la región FR. Cuando se aplica tal mutación, la secuencia de aminoácidos de la región variable después de introducir la mutación preferiblemente tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 90 % o superior, y más preferiblemente la identidad de secuencia de aminoácidos de 95 % o superior, y tiene la identidad de secuencia de aminoácidos de 98 % o superior a la secuencia de aminoácidos original.

[0053] La identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos de la región variable original y la región variable a la cual se ha aplicado la mutación se puede calcular fácilmente utilizando algoritmos de cálculo de homología bien conocidos. Los ejemplos de tales algoritmos incluyen BLAST (Altschul SF, J Mol. Biol. 215, 403-10, (1990)), Pearson and Lipman's Similarity Search Method (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85. 2444 (1988)), and Smith and Waterman's Local Homology Algorithm (Adv. Appl. Math. 2. 482-9 (1981)). Además, el término identidad de secuencia de aminoácidos utilizado en la presente memoria descriptiva se refiere a la identidad de secuencia de aminoácidos calculada por estos algoritmos. En la presente memoria descriptiva, los términos homología de la secuencia de aminoácidos e identidad de secuencia de aminoácidos se utilizan indistintamente.

[0054] A continuación se describirá en detalle un caso en el cual se aplican mutaciones tales como sustitución, deleción y adición a la secuencia de aminoácidos de la región variable del

péptido de afinidad hTfR.

[0055] En un caso donde se sustituyen aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la región variable del péptido de afinidad hTfR con otros aminoácidos, el número de aminoácidos a sustituir es preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 15, aún más preferiblemente de 1 a 10, y aún más preferiblemente de 1 a 5, y el número es, por ejemplo, 1, 2, o 3. En un caso donde se eliminan aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la región variable, el número de aminoácidos a eliminar es preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 15, aún más preferiblemente de 1 a 10, y aún más preferiblemente de 1 a 5, y el número es, por ejemplo, 1, 2, o 3. Además, también es posible aplicar mutaciones que combinen estas sustituciones y deleciones de aminoácidos. En un caso donde se adicionan aminoácidos a la región variable, preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 15, aún más preferiblemente de 1 a 10, y aún más preferiblemente de 1 a 5 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, o 3 aminoácidos, se adicionan en la secuencia de aminoácidos de la región variable o en el N-terminal o el C-terminal de la misma. También es posible aplicar mutaciones que combinen estas adiciones, sustituciones y deleciones de aminoácidos.

[0056] Cuando se aplican mutaciones tales como sustitución, deleción y adición a la secuencia de aminoácidos de la región variable del péptido de afinidad hTfR, las mutaciones se pueden aplicar solamente a la región FR sin aplicar mutaciones a las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR (CDR1, CDR2 y CDR3). El número de aminoácidos a sustituir cuando se aplica la sustitución solamente a la región FR es preferiblemente de 1 a 12, más preferiblemente de 1 a 10, aún más preferiblemente de 1 a 8, y aún más preferiblemente de 1 a 4, y el número es, por ejemplo, 1, 2 o 3. Además, cuando se eliminan aminoácidos solamente de la secuencia de aminoácidos de la región FR, el número de aminoácidos a eliminar es preferiblemente de 1 a 8, más preferiblemente de 1 a 4, aún más preferiblemente de 1 a 3, y aún más preferiblemente de 1 a 2, y el número es, por ejemplo, 1 o 2. También es posible aplicar mutaciones que combinen estas sustituciones y deleciones de aminoácidos. Además, cuando se adicionan aminoácidos sólo a la secuencia de aminoácidos de la región FR, preferiblemente de 1 a 8, más preferiblemente de 1 a 4, aún más preferiblemente de 1 a 3, y aún más preferiblemente de 1 a 2 aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos, se adicionan en la secuencia de aminoácidos de la región variable o en el N-terminal o el C-terminal de la misma. También es posible aplicar mutaciones que combinen estas adiciones, sustituciones y deleciones de aminoácidos.

[0057] Cuando las mutaciones se aplican solamente a la región FR, se conoce un método de sustitución de los residuos de aminoácidos de la región FR del péptido de afinidad hTfR por los residuos de aminoácidos correspondientes a la región FR en la región variable de un anticuerpo humano de tipo IgG. En la presente memoria descriptiva, este método se denomina humanización del péptido de afinidad hTfR. Tal método se divulga en, por ejemplo, Vincle C., et. Al, J Biol Chem. 284. 3273-84 (2009). Cuando el anticuerpo original es un anticuerpo de alpaca, existe la posibilidad

de que el anticuerpo sea reconocido como un antígeno cuando se administra a un humano. Se espera que un anticuerpo humanizado tenga baja antigenicidad en comparación con el anticuerpo original. Cuando la mutación se aplica solamente a la región FR, la humanización es una de las modalidades preferidas. De acuerdo con la presente memoria descriptiva, los péptidos de afinidad hTfR humanizados también se incluirán en el péptido de afinidad hTfR.

[0058] Cuando se aplican mutaciones tales como sustitución, deleción y adición a la secuencia de aminoácidos de la región variable del péptido de afinidad hTfR, las mutaciones se pueden aplicar solamente a las regiones CDR sin aplicar mutaciones a la secuencia de aminoácidos de la región FR. El número de aminoácidos a sustituir cuando la sustitución se aplica solamente a las regiones CDR es preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, y aún más preferiblemente de 1 a 2, y el número es, por ejemplo, 1 o 2. Además, cuando se eliminan aminoácidos solamente de la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR, el número de aminoácidos a eliminar es preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, y aún más preferiblemente de 1 a 2, y el número es, por ejemplo, 1 o 2. También es posible aplicar mutaciones que combinen estas sustituciones y deleciones de aminoácidos. Además, cuando se adicionan aminoácidos solamente a la secuencia de aminoácidos de la región FR, preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, y aún más preferiblemente de 1 a 2 aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos, se adicionan en la secuencia de aminoácidos de la región variable o en el N-terminal o en el C-terminal de la misma. También es posible aplicar mutaciones que combinen estas adiciones, sustituciones y deleciones de aminoácidos.

[0059] La sustitución de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la región variable descrita anteriormente por otro aminoácido tiene lugar, por ejemplo, dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados entre sí en sus cadenas laterales y las propiedades químicas. Se predice que tal sustitución dentro de una familia de aminoácidos no conlleva un cambio significativo en la función del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR (es decir, sustitución conservadora de aminoácidos). Tales familias de aminoácidos incluyen, por ejemplo, las siguientes:

(1) ácido aspártico y ácido glutámico, los cuales son aminoácidos ácidos,

(2) histidina, lisina y arginina, los cuales son aminoácidos básicos,

(3) fenilalanina, tirosina y triptófano, los cuales son aminoácidos aromáticos,

(4) serina y treonina, los cuales son aminoácidos que tienen un grupo hidroxilo (hidroxiaminoácidos),

(6) cisteína, serina, treonina, asparagina y glutamina, los cuales son aminoácidos hidrofílicos neutros,

(7) glicina y prolina, los cuales son aminoácidos que afectan a la orientación de las cadenas peptídicas,

(8) asparagina y glutamina, los cuales son aminoácidos de tipo amida (aminoácidos polares)

(9) alanina, leucina, isoleucina y valina, los cuales son aminoácidos alifáticos,

(10) alanina, glicina, serina y treonina, los cuales son aminoácidos que tienen una cadena lateral pequeña,

(11) alanina y glicina, los cuales son aminoácidos que tienen particularmente una cadena lateral pequeña,

(12) valina, leucina e isoleucina, los cuales son aminoácidos que tienen una cadena ramificada.

[0060] La sustitución conservadora de aminoácidos descrita anteriormente también se aplica al caso donde se sustituye un aminoácido de la secuencia de aminoácidos de otra proteína, tal como albúmina de suero humano (HSA), por otro aminoácido.

[0061] Con respecto al caso de aplicar una mutación a la región variable y adicionar un aminoácido en el C-terminal o en el N-terminal, en un caso donde el péptido de afinidad hTfR se fusiona con una proteína diferente (A), y el aminoácido adicionado se posiciona entre el péptido de afinidad hTfR y la proteína diferente (A), se considera que el aminoácido adicionado constituye una parte del péptido de afinidad hTfR. Con respecto a la proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR y la proteína diferente (A), se describirá a detalle más adelante un enlazador ubicado entre el péptido de afinidad hTfR y la proteína diferente (A). En la presente memoria descriptiva, el término "proteína diferente (A)" se refiere a una proteína distinta del péptido de afinidad hTfR, la cual se debe administrar a un humano en forma de unión al péptido de afinidad hTfR y ejercer una actividad fisiológica en el cuerpo humano.

[0062] El péptido de afinidad hTfR seleccionado por los pasos descritos anteriormente y similares tiene cierta afinidad por hTfR. Al introducir mutaciones tales como sustituciones, deleciones o adiciones en la secuencia de aminoácidos de la región variable de este péptido de afinidad hTfR, la región variable se puede modificar en la región variable de un anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR que tenga las características deseadas. La introducción de la mutación en la secuencia de aminoácidos de la región variable de un anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR se lleva a cabo aplicando la mutación a un gen correspondiente a la secuencia de aminoácidos.

[0063] En la región variable del péptido de afinidad hTfR, la afinidad por el hTfR se puede ajustar adecuadamente aplicando mutaciones tales como sustitución, deleción o adición a la secuencia de aminoácidos que constituye la región variable. Por ejemplo, en un caso donde el péptido de afinidad hTfR tiene alta afinidad por un antígeno del mismo y tiene una constante de disociación notablemente baja en un líquido acuoso, cuando éste se administra en un cuerpo vivo, existe la posibilidad de que la región variable no se disocie del antígeno, y como resultado, pueden producirse problemas funcionales. En tal caso, mediante la introducción mutaciones en la región variable, la constante de disociación se puede ajustar paso a paso de 2 a 5 veces, de 5 a 10 veces, o de 10 a 100 veces, en comparación con la constante de disociación de la región variable original, y se puede adquirir el péptido de afinidad hTfR más preferible y adecuado al propósito. Por el contrario, la constante de disociación también se puede ajustar paso a paso hasta 1/2 a 1/5 veces,

1/5 a 1/10 veces o 1/10 a 1/100 veces en comparación con la constante de disociación de la región variable original al introducir las mutaciones.

[0064] La afinidad de unión del péptido de afinidad hTfR al receptor de transferrina, es decir, la constante de disociación, se puede medir utilizando, por ejemplo, un método que utilice interferometría de biocapa (BLI), específicamente un sistema Octet. La totalidad o una parte del receptor de transferrina derivado de un animal apropiado se inmoviliza en un sensor, la constante de velocidad de unión (Kon) y la constante de velocidad de disociación (Koff) se miden utilizando como muestra una solución que contiene la región variable del péptido de afinidad hTfR, y la constante de disociación se puede calcular a de los resultados de la medición. Del mismo modo, también se puede utilizar un método que utilice la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR), específicamente, un método de utilización de Biacore.

[0065] La introducción de mutaciones tales como sustitución, deleción y adición en la secuencia de aminoácidos de la región variable del péptido de afinidad hTfR se puede llevar a cabo, por ejemplo, utilizando un gen que codifica la región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR como molde, e introduciendo mutaciones en sitios específicos de la secuencia de nucleótidos de un gen por métodos tales como PCR, o introduciendo mutaciones aleatoriamente.

[0066] La introducción de mutaciones en la secuencia de aminoácidos del péptido de afinidad hTfR con el propósito de ajustar la afinidad del péptido de afinidad hTfR a hTfR se puede llevar a cabo, por ejemplo, incorporando un gen que codifique el péptido de afinidad hTfR en un fagémido, produciendo fagos que expresen el péptido de afinidad hTfR en la superficie de la cápside utilizando este fagémido, y permitiendo que un mutágeno o similar actúe sobre los fagos. Los fagos se pueden expandir mientras se introduce la mutación en el gen que codifica el péptido de afinidad hTfR utilizando un mutágeno, y de los fagos expandidos, se pueden seleccionar fagos que expresen un anticuerpo de cadena simple que tenga una constante de disociación deseada por el método descrito anteriormente.

[0067] El péptido de afinidad hTfR que tiene afinidad relativamente alta por hTfR, el cual se obtiene por el método descrito anteriormente, es preferiblemente tal que la constante de disociación ($K_D$) con hTfR medida por el método descrito en el Ejemplo 7 es preferiblemente $5\times10^{-8}$ M o menos, más preferiblemente $2\times10^{-8}$ M o menos, y por ejemplo, $1\times10^{-8}$ o menos, $5\times10^{-9}$ M o menos, o $1\times10^{-9}$ M o menos. Los ejemplos de un péptido de afinidad hTfR adecuado incluyen los que tienen una constante de disociación de $5\times10^{-11}$ M a $1\times10^{-8}$ M, los que tienen una constante de disociación de $2\times10^{-11}$ M a $1\times10^{-8}$ M, y los que tienen una constante de disociación de $1\times10^{-10}$ M a $1\times10^{-8}$ M.

[0068] Al seleccionar un péptido de afinidad hTfR que tiene afinidad por el TfR de mono de los péptidos de afinidad hTfR obtenidos como se describió anteriormente, se puede obtener un péptido que tiene afinidad tanto por el TfR de humano como por el TfR de mono. Un péptido de afinidad hTfR que tiene afinidad por el TfR de mono se puede seleccionar mediante, por ejemplo, un

método ELISA utilizando un TfR de mono recombinante producido utilizando tecnología de recombinación genética. En este método ELISA, un TfR de mono recombinante se pone en fase sólida en una placa, los péptidos de afinidad hTfR se ponen en contacto con el TfR, posteriormente los péptidos que no se unen al TfR de mono recombinante se retiran de la placa, y se mide la cantidad de péptidos de afinidad hTfR retenidos en la placa. Como la cantidad de péptidos de afinidad hTfR retenidos en la placa aumenta cuando la afinidad por el TfR de mono recombinante es superior, por lo tanto, los péptidos de afinidad hTfR correspondientes a la placa en la cual se retiene una mayor cantidad de péptidos de afinidad hTfR, se pueden seleccionar como péptidos de afinidad hTfR que tienen afinidad por el TfR de mono. El término "mono", tal como se utiliza en la presente, se refiere preferiblemente a un mono clasificado como mono antropoide excepto el humano, más preferiblemente un mono clasificado en la familia *Cercopithecidae*, y aún más preferiblemente un mono clasificado en el género Macaca, y el mono es, por ejemplo, un mono cynomolgus o un mono rhesus, y particularmente un mono cynomolgus. Los monos Cynomolgus son convenientes para evaluar la eficacia de un fármaco que utiliza un péptido de afinidad hTfR. Al llevar a cabo pasos similares para el péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR, se puede obtener un péptido de afinidad hTfR que tiene afinidad tanto por el TfR de humano como por el TfR de mono.

[0069] Un péptido de afinidad hTfR que tiene afinidad tanto por el hTfR de humano como por el hTfR de mono tiene el efecto ventajoso de que la farmacocinética que se debe obtener cuando se administra el péptido de afinidad hTfR en el cuerpo humano se puede observar utilizando monos. Por ejemplo, cuando se desarrolla un medicamento utilizando el péptido de afinidad hTfR de una modalidad de la presente invención, dado que algunos de los ensayos no clínicos tales como las pruebas farmacocinéticas del medicamento se pueden llevar a cabo utilizando monos, se puede promover significativamente el desarrollo del medicamento. Lo mismo se puede decir del péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR.

[0070] De acuerdo con la presente invención, un péptido de afinidad hTfR que tiene una afinidad relativamente alta por el hTfR y que también tiene afinidad por el TfR de mono tiene las siguientes constantes de disociación con el TfR de humano y el TfR de mono, particularmente cuando se mide por el método descrito en el Ejemplo 7:

(a) un péptido de afinidad cuyas constantes de disociación con el hTfR y el TfR de mono son ambas de $5\times10^{-9}$ M a $1\times10^{-7}$ M,

(b) un péptido de afinidad cuyas constantes de disociación con el hTfR y el TfR de mono son ambas de $5\times10^{-9}$ M a $5\times10^{-8}$ M,

(d) un péptido de afinidad cuyas constantes de disociación con el hTfR y el TfR de mono son ambas de $1\times10^{-8}$ M a $3\times10^{-8}$ M,

(e) un péptido de afinidad cuyas constantes de disociación con el hTfR y el TfR de mono son

ambas de $1\times10^{-9}$ M a $2\times10^{-7}$ M,

(f) un péptido de afinidad cuyas constantes de disociación con el hTfR y el TfR de mono son ambas de $5\times10^{-9}$ M a $5\times10^{-7}$ M,

En particular, en los puntos (a) a (f) anteriores, la proporción de la constante de disociación con hTfR a la constante de disociación con TfR de mono es tal que cuando el valor de la constante de disociación con hTfR se toma como 1, el valor de la constante de disociación con TfR de mono es preferiblemente de 0.3 a 3.0, y preferiblemente, por ejemplo, de 0.5 a 2.5, de 0.8 a 2.5, de 0.5 a 2.5, o de 0.8 a 1.5.

[0071] Con respecto a los péptidos de afinidad hTfR 1 a 5 de acuerdo con una modalidad de la presente invención, dado que las constantes de disociación con TfR de humano y TfR de mono corresponden a cualquiera de los puntos (a) a (e) descritos anteriormente, se puede decir que cuando estos péptidos de afinidad hTfR se administran a monos, el comportamiento de los mismos en los cuerpos de los monos se aproxima al comportamiento cuando se administran a humanos. Por lo tanto, para los fármacos que utilizan los péptidos de afinidad hTfR 1 a 5, las pruebas que utilizan monos dan resultados que reflejan más fielmente el comportamiento de los fármacos cuando se administran a humanos. Por lo tanto, se pueden obtener resultados más útiles como guía para la realización de pruebas clínicas utilizando humanos por las pruebas que utilizan monos. En particular, los péptidos de afinidad hTfR 1 y 3 a 5 son adecuados porque la proporción de la constante de disociación con hTfR a la constante de disociación con TfR de mono es tal que cuando el valor de la constante de disociación con hTfR se toma como 1, el valor de la constante de disociación con TfR de mono está en el intervalo de 0.5 a 1.5, y por lo tanto, el comportamiento en los cuerpos humanos se puede especular fácilmente del comportamiento en los cuerpos de mono.

[0072] El péptido de afinidad hTfR de acuerdo con una modalidad de la presente invención se puede unir eficientemente, cuando se administra en un cuerpo vivo por inyección intravenosa o similar, al hTfR presente en las células endoteliales de los capilares en el cerebro. El péptido de afinidad hTfR unido al hTfR atraviesa la barrera hematoencefálica por un mecanismo tal como endocitosis, exocitosis o transcitosis, y luego es captado por el cerebro. Por lo tanto, al unir una proteína, un compuesto de bajo peso molecular y similares, los cuales necesitan que se les permita funcionar en el cerebro, a péptidos de afinidad hTfR, se puede permitir que estas sustancias atraviesen eficientemente la barrera hematoencefálica y lleguen al cerebro. Además, se prevé que el péptido de afinidad hTfR de acuerdo con una modalidad de la presente invención alcance el parénquima cerebral, las células similares a las neuronales del hipocampo y el parénquima cerebral cerebeloso, o al menos cualquiera de ellos, después de atravesar la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, al unir fármacos, específicamente una proteína, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico y similares, los cuales necesitan poder actuar en estos tejidos o células, a los péptidos de afinidad hTfR de la presente invención, se puede permitir que estos fármacos lleguen a estos tejidos o células. Un producto en el cual un péptido de afinidad hTfR y un fármaco se unen de esta

manera se denomina complejo péptido de afinidad hTfR-fármaco en la presente memoria descriptiva. Lo mismo se puede decir del péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR.

[0073] En lo que respecta a permitir que sustancias (una proteína, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico y similares) que normalmente no pueden atravesar la barrera hematoencefálica y que, por lo tanto, apenas o nada pueden ejercer una acción fisiológica o farmacológica en el cerebro cuando se administran por vía intravenosa, lleguen al cerebro desde la sangre y ejerzan allí su acción, la formación de complejos con el péptido de afinidad hTfR de acuerdo con una modalidad de la presente invención puede ser un medio eficaz. En particular, se prevé que el péptido de afinidad hTfR de la presente invención llegue al parénquima cerebral, a las células similares a las neuronales del hipocampo, al parénquima cerebral cerebeloso, y similares, o al menos a cualquiera de ellos después de atravesar la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, al administrar esas sustancias en la sangre por administración intravenosa o similar en una forma de estar unidas al péptido de afinidad hTfR de la presente invención, se hace posible que esas sustancias atraviesen la barrera hematoencefálica, lleguen a los tejidos nerviosos centrales y tengan su actividad fisiológica ejercida o potenciada en los tejidos o células del sistema nervioso central. Lo mismo se puede decir del péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR.

[0074] Con respecto a un método de unión de péptidos de afinidad hTfR con esas sustancias (una proteína, un peso molecular bajo, un ácido nucleico y similares), existe un método de unión por medio de un enlazador no peptídico o un enlazador peptídico. Lo mismo se puede decir del péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR. Como enlazador no peptídico, se puede utilizar polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, un polisacárido, dextrano, éter polivinílico, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, una quitina y ácido hialurónico, o derivados de los mismos, o combinaciones de éstos. Un enlazador peptídico es una cadena peptídica que consiste en 1 a 50 aminoácidos enlazados por uniones peptídicas, o un derivado del mismo, y como el N-terminal y el C-terminal del mismo forman cada uno una unión covalente con un péptido de afinidad hTfR o una proteína, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico, o similares, dando como resultado que un anticuerpo anti-hTfR se una a la proteína, compuesto de bajo peso molecular, ácido nucleico, o similares.

[0075] Un producto en el cual el péptido de afinidad hTfR de la presente invención está unido a una proteína diferente (A) deseada utilizando PEG como un enlazador no peptídico se denomina particularmente como péptido de afinidad hTfR-PEG-proteína. El péptido de afinidad hTfR-proteína-PEG se puede producir uniendo un péptido de afinidad hTfR a PEG para producir péptido de afinidad hTfR-PEG, y luego uniendo el péptido de afinidad hTfR-PEG a la proteína diferente (A). Alternativamente, el péptido de afinidad hTfR-PEG-proteína también se puede producir uniendo la proteína diferente (A) a PEG para producir proteína-PEG, y luego uniendo la proteína-PEG a un péptido de afinidad hTfR. Cuando se une PEG al péptido de afinidad hTfR y a la proteína diferente

(A), se utiliza un PEG modificado con un grupo funcional tal como carbonato, carbonilimidazol, un éster activo de un ácido carboxílico, azlactona, imida-tiona cíclica, isocianato, isotiocianato, imidato o aldehído. Como estos grupos funcionales introducidos en el PEG reaccionan principalmente con los grupos amino de las moléculas del péptido de afinidad hTfR y de la proteína diferente (A), el PEG se une covalentemente al péptido de afinidad hTfR y a la proteína diferente (A). No hay limitaciones particulares sobre el peso molecular y la forma del PEG utilizado en este caso; sin embargo, el peso molecular promedio (MW, por sus siglas en inglés) del mismo es preferiblemente de 500 a 60000, y más preferiblemente de 500 a 20000. Por ejemplo, un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 300, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, aproximadamente 2000, aproximadamente 4000, aproximadamente 10000, aproximadamente 20000, o similar, se puede utilizar adecuadamente como enlazador no peptídico. Lo mismo aplica al caso donde un péptido de afinidad hTfR se une a un compuesto de bajo peso molecular deseado, ácido nucleico o similar.

[0076] Por ejemplo, el péptido de afinidad hTfR-PEG se obtiene mezclando un péptido de afinidad hTfR y un polietilenglicol que tiene un grupo aldehído como grupo funcional (ALD-PEG-ALD) de manera que la proporción molar de ALD-PEG-ALD con respecto al anticuerpo sea 1:11, 1:12,5, 1:15, 1:110, 1:120, o similar, adicionando un agente reductor tal como $NaCNBH_3$ a esta mezcla, y haciendo reaccionar la mezcla. A continuación, el péptido de afinidad hTfR-PEG se hace reaccionar con la proteína diferente (A) en presencia del agente reductor tal como NaCNBH3, para obtener el péptido de afinidad hTfR-PEG-proteína. En cambio, el péptido de afinidad hTfR-PEG-proteína se puede obtener uniendo primero la proteína diferente (A) al ALD-PEG-ALD para producir proteína-PEG, y uniendo después la proteína-PEG a un péptido de afinidad hTfR.

[0077] El péptido de afinidad hTfR y la proteína diferente (A) también se pueden unir enlazando el C-terminal o el N-terminal del péptido de afinidad hTfR al N-terminal o al C-terminal de la proteína diferente (A), respectivamente, por medio de un enlazador peptídico o directamente. Una proteína de fusión obtenida uniendo tal péptido de afinidad hTfR a una proteína diferente (A) se puede obtener como proteína recombinante incorporando un fragmento de ADN en el cual un ADNc que codifica la proteína diferente (A) está dispuesto en marco en el 3'-terminal o el 5'-terminal de un ADNc que codifica el péptido de afinidad hTfR, directamente o interponiendo un fragmento de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de un enlazador peptídico, en un vector de expresión para células eucariotas tales como células de mamífero o levadura, o células procariotas tales como Escherichia coli, y cultivando las células huésped en las cuales se ha introducido este vector de expresión. En la presente memoria descriptiva, tal proteína recombinante en la cual se unen un péptido de afinidad hTfR y una proteína diferente (A), se denomina proteína de fusión péptido de afinidad hTfR-proteína (A). Del mismo modo, una proteína recombinante en la cual se unen un péptido de dominio variable único de inmunoglobulina y una proteína diferente (A) , se denomina proteína de fusión de péptido de dominio variable único de inmunoglobulina-proteína (A). Además, una proteína recombinante en la cual se unen un péptido de región variable de anticuerpo de cadena

pesada y una proteína diferente (A) , se denomina proteína de fusión péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada-proteína (A).

[0078] En este caso, el enlazador peptídico dispuesto entre el péptido de afinidad hTfR y la proteína diferente (A) es una cadena peptídica que consiste preferiblemente de 1 a 50, más preferiblemente de 1 a 17, aún más preferiblemente de 1 a 10, y aún más preferiblemente de 1 a 5 aminoácidos; sin embargo, el número de aminoácidos que constituyen el enlazador peptídico se puede ajustar adecuadamente a 1, 2, 3, 1 a 17, 1 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29, 27, o similares, dependiendo de la proteína diferente (A) que se va a unir al anticuerpo anti-hTfR. Tal enlazador peptídico no está limitado en la secuencia de aminoácidos del mismo siempre que el péptido de afinidad hTfR enlazado por el mismo tenga afinidad por el hTfR, y la proteína diferente (A) enlazada por el enlazador peptídico pueda exhibir la actividad fisiológica deseada bajo condiciones fisiológicas; sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos está compuesta de glicina y serina.

[0079] Los ejemplos de un enlazador peptídico preferido incluyen enlazadores peptídicos que consisten en un aminoácido (por ejemplo, glicina o serina), y enlazadores peptídicos que tienen la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:58, y SEQ ID NO:69, y una secuencia en la cual 2 a 10, o 2 a 5 de estas secuencias de aminoácidos están consecutivamente enlazadas. Tal enlazador peptídico tiene una secuencia que consiste en 2 a 50 aminoácidos, o una secuencia que consiste en 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29, o 27 aminoácidos. Por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos Gly-Ser se puede utilizar adecuadamente como enlazador peptídico. Además, un péptido que tiene un total de 25 secuencias de aminoácidos que consisten en cinco secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:32 consecutivamente enlazadas también se puede utilizar adecuadamente como enlazador peptídico.

[0080] El péptido de afinidad hTfR también se puede unir a la región Fc de la IgG humana (región Fc de hIgG). Al unir la región Fc hIgG al péptido de afinidad hTfR, se puede aumentar la estabilidad *in vivo* del péptido de afinidad hTfR, por ejemplo, la retención en sangre. Los ejemplos de tal péptido de afinidad hTfR que tiene la región Fc hIgG unida al mismo incluyen un producto obtenido uniendo la región Fc hIgG al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de un enlazador peptídico, o un producto obtenido uniendo la región Fc hIgG al N-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de un enlazador peptídico. Un conjugado obtenido por unión de una región Fc al péptido de afinidad hTfR se puede unir además a una sustancia (una proteína, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico o similar) que normalmente es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica y que, por lo tanto, puede ejercer una acción fisiológica y farmacológica escasa o nula en el cerebro cuando se administra por vía intravenosa,

para formar un complejo. Tal sustancia se puede unir al conjugado de una región Fc y un péptido de afinidad hTfR, por la técnica descrita anteriormente, por ejemplo, una técnica que utilice PEG. Se prevé que este complejo sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica cuando se administra en el cuerpo vivo por inyección intravenosa o similar, y llegue al parénquima cerebral, a las células similares a las neuronales del hipocampo, al parénquima cerebral cerebeloso y similares. Por lo tanto, al formar el conjugado, la actividad fisiológica de esta sustancia se puede ejercer en los tejidos o células del sistema nervioso central. Además, dado que la estabilidad en sangre del complejo aumenta en comparación con la estabilidad en sangre de un complejo que carece de la región Fc de hIgG, el complejo puede ejercer la eficacia farmacológica durante un periodo de tiempo más largo cuando se administra en el cuerpo vivo. Una proteína en la cual un péptido de afinidad hTfR está unido a la región Fc de la IgG humana se puede obtener como proteína recombinante, de forma similar a la proteína de fusión péptido de afinidad hTfR-proteína (A).

[0081] El péptido de afinidad hTfR, la proteína diferente (A) y la región Fc de hIgG también se pueden unir. Al unirse a la región Fc de hIgG, se puede aumentar la estabilidad *in vivo* del conjugado, por ejemplo, la retención en sangre. Con respecto a tal proteína que tiene una región Fc unida a ella, por ejemplo, existe una proteína en la cual la región Fc de hIgG está unida al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un enlazador peptídico, y el péptido de afinidad hTfR está unido además al C-terminal de la región Fc de hIgG directamente o por medio de un enlazador peptídico. También existe una proteína en la cual la región Fc de hIgG está unida al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de un enlazador peptídico, y la proteína diferente (A) está unida además al C-terminal de la región Fc de hIgG directamente o por medio de una secuencia enlazadora. Además, también existe una proteína en la cual la proteína diferente (A) está unida al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de un enlazador peptídico, y la región Fc de hIgG está unida además al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de una secuencia enlazadora. También existe una proteína en la cual el péptido de afinidad hTfR está unido al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un péptido enlazador, y la región Fc de hIgG está además unida al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de una secuencia enlazadora. Además, también existe una proteína en la cual el péptido de afinidad hTfR está unido al C-terminal de la región Fc de hIgG directamente o por medio de un enlazador peptídico, y la proteína diferente (A) está unida además al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de una secuencia enlazadora. También existe una proteína en la cual la proteína diferente (A) está unida al C-terminal de la región Fc de hIgG directamente o por medio de un enlazador peptídico, y el péptido de afinidad hTfR está unido además al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de una secuencia enlazadora. Una proteína en la cual se unen el péptido de afinidad hTfR, la proteína diferente (A) y la región Fc de hIgG se puede obtener como proteína recombinante, de forma similar a la proteína de fusión péptido de afinidad hTfR-proteína (A).

[0082] El tipo de IgG de la región Fc de hIgG que se va a unir no está particularmente limitado, y se puede utilizar cualquiera de las IgG1 a IgG5. La región Fc de hIgG a introducir puede ser toda la región Fc o puede ser una parte de la misma. Una modalidad preferida de tal región Fc de hIgG puede ser una que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:37, la cual es la región completa de Fc de IgG1 humana.

[0083] El péptido de afinidad hTfR también se puede unir a la albúmina sérica humana (HSA). Al unir la HSA al péptido de afinidad hTfR, se puede aumentar la estabilidad *in vivo* del péptido de afinidad hTfR, por ejemplo, la retención en sangre. Con respecto a tal péptido de afinidad hTfR que tiene HSA unida al mismo, por ejemplo, hay un producto en el cual la HSA está unida al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de un enlazador peptídico, o un producto en el cual la HSA está unida al N-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de un enlazador peptídico. Un conjugado en el cual la HSA está unida al péptido de afinidad hTfR se puede unir además a una sustancia (una proteína, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico o similar) que normalmente es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica y que, por lo tanto, puede ejercer una acción fisiológica y farmacológica escasa o nula en el cerebro cuando se administra por vía intravenosa, para formar un complejo. Tal sustancia se puede unir al conjugado de la HSA y el péptido de afinidad hTfR por las técnicas descritas anteriormente, por ejemplo, una técnica que utilice PEG. Se prevé que este complejo sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica cuando se administra en el cuerpo vivo por inyección intravenosa o similar, y llegue al parénquima cerebral, a las células similares a las neuronales del hipocampo, al parénquima cerebral cerebeloso y similares. Por lo tanto, al formar el conjugado, la actividad fisiológica de esta sustancia se puede ejercer en los tejidos o células del sistema nervioso central. Además, dado que la estabilidad en sangre del complejo aumenta en comparación con la estabilidad en sangre de un complejo que carece de HSA, el complejo puede ejercer la eficacia farmacológica durante un periodo de tiempo más largo cuando se administra en el cuerpo vivo. Una proteína en la cual un péptido de afinidad hTfR está unido a la HSA se puede obtener como proteína recombinante, de forma similar a la proteína de fusión péptido de afinidad hTfR-proteína (A).

[0084] La HSA se puede unir además a la proteína de fusión péptido de afinidad hTfR-proteína (A). Con respecto a tal proteína que tiene HSA unida a la misma, por ejemplo, hay una proteína en la cual la HSA está unida al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un enlazador peptídico, y el péptido de afinidad hTfR está unido además al C-terminal de la HSA directamente o por medio de un enlazador peptídico. Además, hay una proteína en la cual la HSA está unida al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de un enlazador peptídico, y la proteína diferente (A) está unida además al C-terminal de la HSA directamente o por medio de una secuencia enlazadora. Además, también hay una proteína en la cual la proteína diferente (A) está unida al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de un enlazador peptídico, y la HSA está unida además al C-terminal de la proteína diferente (A)

directamente o por medio de una secuencia enlazadora. Además, también hay una proteína en la cual el péptido de afinidad hTfR está unido al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de un enlazador peptídico, y la HSA está unida además al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de una secuencia enlazadora. También hay proteínas en las cuales el péptido de afinidad hTfR está unido al C-terminal de la HSA directamente o por medio de un enlazador peptídico, y la proteína diferente (A) está unida además al C-terminal del péptido de afinidad hTfR directamente o por medio de una secuencia enlazadora. Además, también existe una proteína en la cual la proteína diferente (A) está unida al C-terminal de la HSA directamente o por medio de un enlazador peptídico, y el péptido de afinidad hTfR está unido además al C-terminal de la proteína diferente (A) directamente o por medio de una secuencia enlazadora. Se puede obtener como proteína recombinante una proteína en la cual están unidos el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina hTfR, una proteína diferente (A) y la HSA, de forma similar a la proteína de fusión péptido de dominio variable único de inmunoglobulina hTfR-proteína (A). Una proteína recombinante obtenida de esta manera también se incluye en la proteína de fusión péptido de afinidad hTfR-proteína (A).

[0085] La HSA descrita anteriormente es preferiblemente una HSA de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:38; sin embargo, sin limitarse a esto, la HSA también puede ser una HSA de tipo mutante obtenida aplicando sustituciones, deleciones o adiciones en la secuencia de aminoácidos de la HSA de tipo silvestre, siempre que se pueda mejorar la estabilidad en sangre de una sustancia unida a la misma.

[0086] En lugar de la HSA, también se puede utilizar una sustancia que tiene afinidad por la albúmina. Dado que una sustancia que tiene afinidad por la albúmina se une a la albúmina en sangre, la vida media en sangre de una proteína de fusión de un anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR y una proteína diferente (A) o similar que se ha administrado en el cuerpo vivo se puede aumentar como en el caso de utilizar la HSA. Como sustancia que tiene afinidad por la albúmina, por ejemplo, un péptido obtenido modificando el dominio de unión a la albúmina de una proteína derivada de la cepa de *Streptococcus* G418, la cual tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:39 (Alm T. Biotechnol J. 5. 605-17 (2010)), se puede utilizar con el fin de exhibir resistencia a los álcalis.

[0087] La afinidad de unión por la albúmina de la proteína de fusión péptido de afinidad hTfR-proteína (A) en la cual se ha introducido un péptido de afinidad por la albúmina, es preferiblemente $1\times10^{-7}$ M o menos, más preferiblemente $5\times10^{-7}$ M o menos, aún más preferiblemente $1\times10^{-8}$ M o menos, y aún más preferiblemente $1\times10^{-9}$ M o menos, cuando se mide por interferometría de biocapa descrita en el Ejemplo 7.

[0088] Una pluralidad de péptidos de afinidad hTfR se pueden enlazar directamente o por medio de enlazadores peptídicos. En este caso, la pluralidad de péptidos de afinidad hTfR a unir pueden tener todos la misma secuencia de aminoácidos o pueden tener secuencias de aminoácidos

diferentes. No hay ninguna limitación particular en cuanto al número de péptidos de afinidad hTfR que se van a unir; sin embargo, por ejemplo, el número es de 2 a 10, de 2 a 5, 2 o 3. Al unir una pluralidad de péptidos de afinidad hTfR, se pueden impartir propiedades tales como una afinidad mejorada por el anti-hTfR. En la presente memoria descriptiva, un producto obtenido enlazando una pluralidad de péptidos de afinidad hTfR de esta manera se denomina péptido de afinidad hTfR en tándem. El péptido de afinidad hTfR en tándem está incluido en el péptido de afinidad hTfR. Lo mismo se puede decir del péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR.

[0089] Un enlazador peptídico utilizado para enlazar el péptido de afinidad hTfR descrito anteriormente a la región Fc de hIgG o a la HSA consiste preferiblemente en 1 a 50 aminoácidos. Aquí, el número de aminoácidos se ajusta adecuadamente de 1 a 17, de 1 a 10, de 10 a 40, de 20 a 34, de 23 a 31, de 25 a 29, 27, o similares. No existe ninguna limitación en cuanto a la secuencia de aminoácidos de tal enlazador peptídico, siempre y cuando el péptido de afinidad hTfR enlazado tenga afinidad por el hTfR, y la región Fc de hIgG o la HSA enlazada por el enlazador peptídico puedan ejercer las funciones deseadas bajo condiciones fisiológicas; sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos se compone de glicina y serina. Lo mismo aplica al enlazador peptídico utilizado para unir el péptido de afinidad hTfR, la proteína diferente (A) y la región Fc de hIgG. Lo mismo aplica al enlazador peptídico utilizado para unir el péptido de afinidad hTfR, la proteína diferente (A) y la HSA. Además, lo mismo aplica al enlazador peptídico utilizado para unir una pluralidad de péptidos de afinidad hTfR.

[0090] Los ejemplos de un enlazador peptídico preferido incluyen un enlazador peptídico que consiste en un aminoácido, ya sea glicina o serina, y enlazadores peptídicos que tienen la secuencia de aminoácidos Gly-Ser, la secuencia de aminoácidos Ser-Ser, la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:58, y SEQ ID NO:69, y una secuencia que tiene de 2 a 10, o de 2 a 5 de estas secuencias de aminoácidos enlazadas consecutivamente. Tal enlazador peptídico tiene una secuencia que consiste en 2 a 50 aminoácidos, o una secuencia que consiste en 2 a 17, 2 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29, o 27 aminoácidos. Por ejemplo, un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos Gly-Ser se puede utilizar adecuadamente como enlazador peptídico. Además, un enlazador peptídico que tiene un total de 25 secuencias de aminoácidos que consisten en cinco secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:32 enlazadas consecutivamente también se puede utilizar adecuadamente como enlazador peptídico.

[0091] El péptido de afinidad hTfR y la proteína de fusión péptido de afinidad hTfR-proteína (A) también se pueden estabilizar en sangre por un método distinto de los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, se puede aumentar la estabilidad en sangre modificando estas proteínas con PEG. Tal técnica se implementa generalmente en el campo de los medicamentos proteicos y eritropoyetina PEGilada, interferón y similares se han puesto en uso práctico como productos farmacéuticos. Además, el péptido de afinidad hTfR también se puede estabilizar introduciendo una

mutación en el mismo.

[0092] No existe ninguna limitación particular en la proteína diferente (A) que se va a unir al péptido de afinidad hTfR; sin embargo, dado que la proteína diferente (A) es una proteína que puede ejercer una actividad fisiológica en el cuerpo vivo, y en particular una proteína que debe poder llegar al cerebro para ejercer su función, pero que sin embargo no se puede esperar que funcione en el cerebro cuando se administra por vía intravenosa porque la proteína no puede atravesar la barrera hematoencefálica tal cual. Ejemplos de tales proteínas incluyen enzimas lisosomales tales como iduronato-2-sulfatasa (IDS), glucocerebrosidasa (GBA), β-galactosidasa, proteína activadora GM2, β-hexosaminidasa A, β-hexosaminidasa B, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, α-manosidasa (LAMAN), β-manosidasa, galactosilceramidasa (GALC), saposina C, arilsulfatasa A (ARSA), α-L-fucosidasa (FUCA1), aspartilglucosaminidasa, α-N-acetilgalactosaminidasa, esfingomielinasa ácida (ASM), α-galactosidasa A, β-glucuronidasa (GUSB), heparán-N-sulfatasa (SGSH), α-N-acetilglucosaminidasa (NAGLU), acetil CoA α-glucosaminida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, ceramidasa ácida (AC), amilo-1,6-glucosidasa, sialidasa, aspartilglucosaminidasa, palmitoil proteína tioesterasa-1 (PPT-1), tripeptidil peptidasa-1 (TPP-1), hialuronidasa-1, α-glucosidasa ácida (GAA), CLN1 y CLN2. Lo mismo se puede decir del péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR.

[0093] Un péptido de afinidad hTfR unido a α-L-iduronidasa (IDUA) se puede utilizar como agente terapéutico para el síndrome de Hurler o el síndrome de Hurler-Scheie, un péptido de afinidad hTfR unido a iduronato-2-sulfatasa (IDS) se puede utilizar como agente terapéutico para el síndrome de Hunter, un péptido de afinidad hTfR unido a glucocerebrosidasa (GBA) se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Gaucher, un péptido de afinidad hTfR unido a β-galactosidasa se puede utilizar como agente terapéutico para la GM1-gangliosidosis tipos 1 a 3, un péptido de afinidad hTfR unido a la proteína activadora GM2 se puede utilizar como agente terapéutico para la GM2-gangliosidosis variante AB, un péptido de afinidad hTfR unido a la β-hexosaminidasa A se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Sandhoff y la enfermedad de Tay-Sachs, un péptido de afinidad hTfR unido a la β-hexosaminidasa B se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Sandhoff, un péptido de afinidad hTfR unido a la N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de I-Cell, un péptido de afinidad hTfR unido a la α-mannosidasa (LAMAN) se puede utilizar como agente terapéutico para la α-mannosidosis, un péptido de afinidad hTfR unido a β-mannosidasa se puede utilizar como agente terapéutico para la β-mannosidosis, un péptido de afinidad hTfR unido a galactosilceramidasa (GALC) se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Krabbe, un péptido de afinidad hTfR unido a saposina C se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de almacenamiento similar a Gaucher, un péptido de afinidad hTfR unido a la arilsulfatasa A (ARSA) se puede utilizar como agente terapéutico para la

leucodistrofia metacromática, un péptido de afinidad hTfR unido a la α-L-fucosidasa (FUCA1) se puede utilizar como agente terapéutico para la fucosidosis, un péptido de afinidad hTfR unido a aspartilglucosaminidasa se puede utilizar como agente terapéutico para la aspartilglucosaminuria, un péptido de afinidad hTfR unido a α-N-acetilgalactosaminidasa se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Schindler y la enfermedad de Kawasaki, un péptido de afinidad hTfR unido a la esfingomielinasa ácida (ASM) se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Niemann-Pick, un péptido de afinidad hTfR unido a la α-galactosidasa A se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Fabry, un péptido de afinidad hTfR unido a β-glucuronidasa (GUSB) se puede utilizar como agente terapéutico para el síndrome de Sly, un péptido de afinidad hTfR unido a heparán N-sulfatasa (SGSH) se puede utilizar como agente terapéutico para el síndrome de Sanfilippo A, un péptido de afinidad hTfR unido a α-N-acetilglucosaminidasa (NAGLU) se puede utilizar como agente terapéutico para el síndrome de Sanfilippo B, un péptido de afinidad hTfR unido a la acetil CoA α-glucosaminida N-acetiltransferasa y un péptido de afinidad hTfR unido a la N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa se pueden utilizar como agentes terapéuticos para el síndrome de Sanfilippo, un péptido de afinidad hTfR unido a ceramidasa ácida (AC) se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Farber, un péptido de afinidad hTfR unido a amilo-1,6-glucosidasa se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Cori (enfermedad de Forbes-Cori), un péptido de afinidad hTfR unido a la sialidasa se puede utilizar como agente terapéutico para los trastornos del sistema nervioso central en la deficiencia de sialidasa, un péptido de afinidad hTfR unido a la proteína palmitoil tioesterasa-1 (PPT-1) se puede utilizar como agente terapéutico para la ceroide-lipofuscinosis neuronal o la enfermedad de Santavuori-Haltia, un péptido de afinidad hTfR unido a tripeptidil peptidasa-1 (TPP-1) se puede utilizar como agente terapéutico para la ceroidolipofuscinosis neuronal o la enfermedad de Jansky-Bielschowsky, un péptido de afinidad hTfR unido a hialuronidasa-1 se puede utilizar como agente terapéutico para la deficiencia de hialuronidasa, un péptido de afinidad hTfR unido a α-glucosidasa ácida (GAA) se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Pompe, y los péptidos de afinidad hTfR unidos a CLN1 y CLN2 se pueden utilizar como agentes terapéuticos para la enfermedad de Batten. Los péptidos de afinidad hTfR unidos a las enzimas lisosomales descritas anteriormente se pueden utilizar particularmente como agentes terapéuticos para trastornos del sistema nervioso central en enfermedades lisosomales. Por ejemplo, un péptido de afinidad hTfR unido a α-L-iduronidasa (IDUA) se puede utilizar como agente terapéutico para los trastornos del sistema nervioso central en el síndrome de Hurler o el síndrome de Hurler-Scheie. Además, las aplicaciones de uso farmacéutico no se limitan a estas enfermedades.

[0094] Además de éstos, los ejemplos de la proteína que se puede unir a un péptido de afinidad hTfR y ejercer eficacia farmacológica incluyen factores de crecimiento, fármacos anticuerpos, citocinas, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento nervioso derivado

del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurotrofina 3, neurotrofina 4/5, neurotrofina 6, neuregulina 1, eritropoyetina, darbepoetina, activina, factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento fibroblástico 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 y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), receptor αdel factor de necrosis tumoral (TNF-αR), ligando PD-1, PD-L1, PD-L2, una enzima que tiene actividad de degradación de beta-amiloide, anticuerpo anti-beta-amiloide, anticuerpo anti-BACE, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-PD-L2, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-TNF-α y anticuerpo anti-CTLA-4.

[0095] Un péptido de afinidad hTfR unido al factor de crecimiento nervioso (NGF) se puede utilizar como agente terapéutico de trastornos neurológicos para la enfermedad de Alzheimer, un péptido de afinidad hTfR unido al factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) se puede utilizar como agente terapéutico de trastornos neurológicos para la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y similares, un péptido de afinidad hTfR unido al CNTF se puede utilizar como agente terapéutico para la esclerosis lateral amiotrófica, un péptido de afinidad hTfR unido a GDNF, neurotrofina 3 o neurotrofina 4/5 se puede utilizar como agente terapéutico para la isquemia cerebral, un péptido de afinidad hTfR unido a GDNF se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Parkinson, un péptido de afinidad hTfR unido a neuregulina 1 se puede utilizar como agente terapéutico para la esquizofrenia, un péptido de afinidad hTfR unido a eritropoyetina o darbepoyetina se puede utilizar como agente terapéutico para la isquemia cerebral, un péptido de afinidad hTfR unido a bFGF o FGF2 se puede utilizar como agente terapéutico para trastornos traumáticos del sistema nervioso central y para la recuperación después de cirugía cerebral o cirugía de la columna vertebral, un péptido de afinidad hTfR unido a una enzima que tiene una actividad de degradación de beta-amiloide, un anticuerpo anti-beta-amiloide, o un anticuerpo anti-BACE se puede utilizar como agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer, un péptido de afinidad hTfR unido a un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-HER2, o un anticuerpo anti-CTLA-4 se puede utilizar como agente terapéutico para tumores en el sistema nervioso central, incluyendo tumores cerebrales, y un péptido de afinidad hTfR unido a TNFαR se puede utilizar como agente terapéutico para isquemia cerebral y enfermedades inflamatorias cerebrales.

[0096] Agentes terapéuticos para enfermedades tales como enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington, trastornos mentales tales como esquizofrenia y depresión, esclerosis múltiple,

esclerosis lateral amiotrófica, tumores en el sistema nervioso central incluyendo tumores cerebrales, enfermedades lisosomales acompañadas de daño cerebral, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, distrofia muscular, isquemia cerebral, enfermedades inflamatorias cerebrales, enfermedades priónicas y trastornos traumáticos del sistema nervioso central, puede ser generalmente la proteína diferente (A) a fusionar con el péptido de afinidad hTfR. Además, los agentes terapéuticos para los trastornos virales y bacterianos del sistema nervioso central también pueden ser generalmente la proteína diferente (A) que se va a fusionar con el péptido de afinidad hTfR. Además, los fármacos que se pueden utilizar para la recuperación después de la cirugía cerebral y la cirugía espinal también pueden ser generalmente la proteína diferente (A) que se va a fusionar con el péptido de afinidad hTfR.

[0097] Los utilizados como agentes terapéuticos en la presente invención también se pueden utilizar para prevenir la aparición de enfermedades.

[0098] Las proteínas enumeradas anteriormente como la proteína diferente (A) que se unirá al péptido de afinidad hTfR son normalmente proteínas de tipo silvestre. Sin embargo, los mutantes en los cuales uno o una pluralidad de aminoácidos entre los aminoácidos que constituyen estas proteínas de tipo silvestre han sido sustituidos por otros aminoácidos, eliminados, o similares, también se incluyen en estas proteínas siempre y cuando los mutantes tengan la actividad fisiológica original de las proteínas. Aquí, una proteína que tiene su actividad fisiológica original significa que la proteína tiene un 20 % o más de la actividad fisiológica de la proteína de tipo silvestre. La actividad fisiológica de la proteína con respecto a la actividad fisiológica de la proteína de tipo silvestre es más preferiblemente 40 % o más, aún más preferiblemente 50 % o más, aún más preferiblemente 80 % o más, y aún más preferiblemente 90 % o más.

[0099] La secuencia de aminoácidos de una proteína de tipo mutante tiene preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o más, más preferiblemente tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 85 % o más, aún más preferiblemente tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 90 % o más, y aún más preferiblemente tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 95 % o más, y por ejemplo, tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 98 % o más.

[0100] En un caso donde la secuencia de aminoácidos de una proteína diferente de tipo silvestre (A) se sustituye con otros aminoácidos para producir una forma mutante, el número de aminoácidos a sustituir es preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5, y aún más preferiblemente de 1 a 3. En un caso donde se eliminan aminoácidos, el número de aminoácidos a eliminar es preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5, y aún más preferiblemente de 1 a 3. Además, se puede producir una forma mutante deseada combinando estas sustituciones y deleciones de aminoácidos. Además, los productos que tienen uno o una pluralidad de aminoácidos adicionados en la secuencia de aminoácidos o en el N-terminal o C-terminal de la proteína diferente de tipo silvestre (A) o un mutante de la misma, también se incluyen en estas proteínas siempre que

los productos conserven las funciones de estas proteínas total o parcialmente. El número de aminoácidos a adicionar en este caso es preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5, e incluso más preferiblemente de 1 a 3. Se puede producir una forma mutante deseada combinando estas adiciones, sustituciones y deleciones de aminoácidos.

[0101] En un caso donde la mutación se aplica en estas proteínas diferentes (A) para adicionar aminoácidos en el C-terminal o en el N-terminal, y en un caso donde los aminoácidos adicionados se ubican entre estas proteínas y el péptido de afinidad hTfR cuando estas proteínas se fusionan con el péptido de afinidad hTfR, se considera que los aminoácidos adicionados constituyen una parte de las proteínas diferentes (A).

[0102] Cuando la proteína diferente (A) es IDS humana, una proteína de fusión preferiblemente incluye los siguientes números (1) a (4):

(1) una proteína de fusión en la cual el N-terminal de hIDS está unido al C-terminal de un péptido de afinidad hTfR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, o SEQ ID NO:55 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59,

(2) una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, en la cual el N-terminal de hIDS está unido al C-terminal del péptido de afinidad hTfR 5 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59,

(3) una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, en la cual el N-terminal de hIDS está unido al C-terminal del péptido de afinidad hTfR 6 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, y

(4) una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, en la cual el N-terminal del péptido de afinidad hTfR 5 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 está unido al C-terminal del péptido de afinidad hTfR 5 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, y el N-terminal de hIDS se une además al C-terminal del péptido de afinidad hTfR 5 anterior por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos GS.

[0103] Cuando la proteína diferente (A) es SGSH humana, una proteína de fusión preferible incluye las siguientes proteínas de fusión. Es decir,

(1) una proteína de fusión en la cual el N-terminal de hSGSH está unido al C-terminal de un péptido de afinidad hTfR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, o SEQ ID NO:55 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, y

(2) una proteína de fusión en la cual el N-terminal de hSGSH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66 está unido al C-terminal del péptido de afinidad hTfR 3 que tiene la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59.

[0104] El trastuzumab es un medicamento de anticuerpo que ejerce un efecto antitumoral al unirse específicamente al HER2, el cual está codificado por el oncogén humano HER2/neu(c-erbB-2). El trastuzumab está compuesto por cadenas pesadas y cadenas ligeras, y las respectivas secuencias de aminoácidos de las cadenas se establecen en SEQ ID NO:40 y SEQ ID NO:41, respectivamente.

[0105] Una modalidad específica de la proteína de fusión de un péptido de afinidad hTfR y una proteína diferente (A) de acuerdo con la presente invención es una proteína de fusión de un péptido de afinidad hTfR y trastuzumab, en la cual el péptido de afinidad hTfR 1 está unido al C-terminal de una cadena pesada de trastuzumab por medio de un enlazador. La proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR 1 y trastuzumab se puede producir cultivando células huésped en las cuales un vector de expresión para una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 (proteína de fusión de cadena pesada de péptido de afinidad hTfR 1-trastuzumab), en la cual el péptido de afinidad hTfR 1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 está unido al C-terminal de una cadena pesada de trastuzumab por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y se han introducido un vector de expresión para la proteína de la cadena ligera de trastuzumab. En otras modalidades, también se pueden producir proteínas de fusión de péptidos de afinidad hTfR y trastuzumab de otras modalidades utilizando vectores de expresión para una proteína de fusión de cadena pesada de péptido de afinidad hTfR 2-trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una proteína de fusión de cadena pesada de péptido de afinidad hTfR 3-trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, una proteína de fusión de cadena pesada de péptido de afinidad hTfR 4-trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una proteína de fusión de cadena pesada de péptido de afinidad hTfR 5-trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, en lugar del vector de expresión del vector de expresión para la proteína de fusión de cadena pesada de péptido de afinidad hTfR 1-trastuzumab. También se puede utilizar un vector de expresión para una proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR 6 y la cadena pesada de trastuzumab.

[0106] El trastuzumab se utiliza principalmente como agente terapéutico para el cáncer de mama; sin embargo, dado que el trastuzumab no puede atravesar la BBB cuando se inyecta por vía intravenosa, no puede ejercer eficacia farmacológica contra los cánceres en el sistema nervioso central. Sin embargo, cuando el trastuzumab se une a un péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR, el trastuzumab puede atravesar la BBB y, por lo tanto, puede actuar incluso contra los cánceres que expresan HER2 en el sistema nervioso central. Dado que el cáncer de mama puede hacer metástasis en el sistema nervioso central, cabe esperar que el conjugado sea eficaz contra tales cánceres en el sistema nervioso central que hayan hecho metástasis del cáncer

de mama.

[0107] Los medicamentos de anticuerpo distintos del trastuzumab también se pueden producir como proteínas de fusión con péptidos de región variable de anticuerpos de cadena pesada anti-hTfR, de forma similar al trastuzumab. En este caso, el péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR puede estar unido al C-terminal de una cadena pesada de un anticuerpo, puede estar unido al N-terminal de una cadena pesada de un anticuerpo, puede estar unido al C-terminal de una cadena ligera de un anticuerpo, o puede estar unido al N-terminal de una cadena ligera de un anticuerpo.

[0108] El fármaco que se va a unir al péptido de afinidad hTfR para formar un complejo farmacológico puede ser un compuesto de bajo peso molecular. Aquí, el compuesto de bajo peso molecular es preferiblemente un compuesto que debe poder atravesar la BBB y actuar sobre el sistema nervioso central; sin embargo, sin estar limitado a esto, el compuesto de bajo peso molecular puede ser un agente de contraste, un colorante fluorescente, un fosfolípido que puede ser un componente constituyente de liposomas, un lípido funcional que puede ser un componente constituyente de nanopartículas lipídicas, o similares. El peso molecular del compuesto de bajo peso molecular es, por ejemplo, de 1 a 50 kD, de 0.5 a 20 kD, o de 1 a 5 kD. También se incluyen en el compuesto de bajo peso molecular un péptido compuesto de 5 a 20 aminoácidos y un polisacárido que tiene una estructura formada mediante condensación por deshidratación de 5 a 20 monosacáridos.

[0109] El péptido de afinidad hTfR y el compuesto de bajo peso molecular se unen por unión covalente directamente o por medio de un enlazador. El modo de unión del péptido de afinidad hTfR y el compuesto de bajo peso molecular no está particularmente limitado siempre que se mantenga la afinidad de unión del péptido de afinidad hTfR al hTfR, y el fármaco ejerza eficacia farmacológica en el sistema nervioso central cuando se administre un complejo péptido de afinidad hTfR-fármaco en el cuerpo vivo. Como enlazador se utiliza, por ejemplo, un enlazador que contiene valina-citrulina o valina-alanina, las cuales son escindidas por la catepsina B, o un enlazador que contiene cisteína-cisteína. Cuando tal enlazador se administra en un cuerpo vivo, dado que el enlazador puede ser escindido por el mecanismo metabólico en el cuerpo vivo, por ejemplo, por una enzima, el compuesto de bajo peso molecular se puede separar del péptido de afinidad hTfR y ejercer eficacia farmacológica por sí mismo. En la presente memoria descriptiva, tal enlazador que puede escindirse in vivo se denomina enlazador biodegradable.

[0110] Cuando un péptido de afinidad hTfR y un compuesto de bajo peso molecular están unidos por un enlazador biodegradable, es posible disponer un espaciador entre estos además del enlazador. Al disponer un espaciador, se mejora la accesibilidad de la enzima que escinde el enlazador al complejo. Tal espaciador no se limita particularmente a éstos; sin embargo, un grupo p-aminocarbamato/grupo carbamato se utiliza convenientemente.

[0111] El fármaco en el complejo péptido de afinidad hTfR-fármaco puede ser un ácido

nucleico. Aquí, el ácido nucleico puede ser cualquiera de ADN monocatenario, ADN bicatenario, ARN monocatenario y ARN bicatenario. Para evitar la degradación de los ácidos nucleicos por las nucleasas en el cuerpo vivo, los nucleótidos que constituyen estos ácidos nucleicos se pueden modificar para hacer que los ácidos nucleicos sean resistentes a las nucleasas. La longitud de la cadena del ácido nucleico no está particularmente limitada; sin embargo, la longitud de la cadena es, por ejemplo, de 10 pb a 1000 pb, o de 10 pb a 100 pb. En este complejo, el péptido de afinidad hTfR y el ácido nucleico se unen por unión covalente directamente o por medio de un enlazador. El modo de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina y un compuesto de bajo peso molecular no está particularmente limitado mientras se mantenga la afinidad de unión del péptido de afinidad hTfR al hTfR, y el fármaco ejerza eficacia farmacológica en el sistema nervioso central cuando el complejo péptido de afinidad hTfR-ácido nucleico se administre en el cuerpo vivo. Como enlazador, se utiliza preferiblemente un enlazador biodegradable.

[0112] Cuando un péptido de afinidad hTfR y un ácido nucleico están unidos por un enlazador biodegradable, es posible disponer un espaciador entre estos además del enlazador. Al disponer un espaciador, se mejora la accesibilidad del ácido nucleico que escinde el enlazador al complejo. Tal espaciador no se limita particularmente a éstos; sin embargo, un grupo p-aminocarbamato/grupo carbamato se utiliza convenientemente.

[0113] El ácido nucleico que se va a unir al péptido de afinidad hTfR es, por ejemplo, un ácido nucleico utilizado para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. Tal ácido nucleico es un ácido nucleico antisentido contra el ARNm cuya expresión en el sistema nervioso central está anormalmente aumentada. Tal ácido nucleico antisentido se une a un ARNm que se expresa anormalmente, y exhibe un efecto de inhibición de la traducción del ARNm en una proteína.

[0114] Un complejo péptido de afinidad hTfR-fármaco ( incluyendo una proteína de fusión péptido de afinidad hTfR-proteína(A)) se puede suministrar a instituciones médicas como un fármaco (composición farmacéutica) que contiene el complejo como ingrediente activo, en forma de producto liofilizado, una preparación líquida acuosa, o similares. En el caso de una preparación líquida acuosa, el complejo péptido de afinidad hTfR-fármaco se puede disolver preliminarmente en una solución que contiene un estabilizador, un agente amortiguador y un agente de ajuste de tonicidad, y esta solución se puede suministrar como una preparación contenida en un vial o una jeringa. Un preparado contenido en una jeringa se denomina generalmente preparado de jeringa precargada. Cuando se prepara en un preparado de jeringa precargada, se puede facilitar la administración de un fármaco por el propio o la propia paciente. La administración del fármaco se realiza por medios parenterales, por ejemplo, inyección intravenosa. El fármaco administrado puede atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer eficacia farmacológica en el sistema nervioso central, por ejemplo, el fármaco puede ejercer eficacia farmacológica en corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, mesencéfalo, puente de Varolio, médula oblonga, núcleo caudado, putamen, globo pálido, tálamo e hipotálamo, en particular puede ejercer eficacia farmacológica en corteza cerebral, cerebelo,

hipocampo y mesencéfalo.

[0115] El péptido de afinidad hTfR se puede utilizar para modificar la superficie de vesículas en las cuales se pueden contener fármacos. Ejemplos de vesículas incluyen liposomas y nanopartículas lipídicas (LNP). Un liposoma se refiere a una vesícula esférica que tiene una bicapa lipídica, y generalmente incluye fosfolípidos, en particular fosfatidilcolina, como componente constituyente. Además, el liposoma también puede incluir otros lípidos tales como la fosfatidiletanolamina de yema de huevo como componentes constituyentes. Una nanopartícula lipídica se refiere a una partícula que tiene un diámetro de 10 nm a 1000 nm, típicamente menos de aproximadamente 200 nm, y que contiene lípidos como componente principal, y una nanopartícula lipídica puede contener una molécula hidrofóbica (lipofílica) y contiene lípidos biocompatibles tales como triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y esteroides, como componentes constituyentes principales. Estas vesículas pueden tener fármacos contenidos en su interior.

[0116] Cuando se administran al cuerpo vivo vesículas que tienen un fármaco contenido en su interior, las membranas que constituyen las vesículas se fusionan con la membrana celular y el fármaco se libera en las células. Es decir, estas vesículas se pueden utilizar como portadoras de un fármaco. Cuando se dispone un péptido de afinidad hTfR en la superficie de tales vesículas, las vesículas se unen, por medio del péptido, al hTfR de las células endoteliales cerebrovasculares que constituyen la barrera hematoencefálica, y el fármaco contenido en las vesículas se puede liberar en el parénquima cerebral, tal como el parénquima cerebral cerebeloso, a medida que las vesículas se fusionan con la membrana celular de las células endoteliales cerebrovasculares, o a medida que las vesículas son absorbidas por las células por endocitosis o similares.

[0117] El término vesícula utilizado en la presente memoria descriptiva se debe interpretar para incluir, además de los liposomas y nanopartículas lipídicas descritos anteriormente, nanopartículas poliméricas, micelas, una emulsión, una nanoemulsión, microesferas, nanoesferas, microcápsulas, nanocápsulas, un dendrímero, un nanogel, nanopartículas metálicas y todas las demás nanopartículas y micropartículas que se pueden utilizar como sistemas de liberación de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés).

**Ejemplos**

[0118] A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos; sin embargo, la presente invención no pretende limitarse a los ejemplos.

[0119] [Ejemplo 1] Construcción del vector para la expresión de hTfR

Se amplificó por PCR un fragmento de gen que codifica el receptor de transferrina humano (hTfR) utilizando bazo humano Quick Clone ADNc (Clontech Laboratories, Inc.) como molde y utilizando el cebador hTfR5' (SEQ ID NO:49) y el cebador hTfR3' (SEQ ID NO:50). El fragmento de gen amplificado que codifica el hTfR se digirió con MluI y NotI y se insertó entre los sitios de MluI y NotI de un vector pCI-neo (Promega Corporation). El vector obtenido se nombró pCI-neo(hTfR). A continuación, este vector se digirió con MluI y NotI para escindir el fragmento de gen que codifica

hTfR, y el fragmento de gen escindido se incorporó entre los sitios de MluI y NotI de pE-mIRES-GS-puro, el cual es un vector de expresión descrito en la Publicación Internacional PCT (WO 2012/063799), para construir pE-mIRES-GS-puro(hTfR), el cual era un vector para la expresión de hTfR.

[0120] [Ejemplo 2] Producción de hTfR recombinante

Se introdujo pE-mIRES-GS-puro(hTfR) en células CHO-K1 por un método de electroporación, posteriormente las células se sometieron a cultivo selectivo utilizando medio CD OptiCHO™ (Invitrogen, Inc.) que contenía metionina sulfoximina (MSX) y puromicina, y se obtuvieron células recombinantes que expresan hTfR. Estas células que expresaron hTfR recombinante se cultivaron para preparar hTfR recombinante (rhTfR).

[0121] [Ejemplo 3] Producción de una biblioteca de fagos

Se inmunizaron alpacas utilizando el rhTfR preparado en el ejemplo 2 como antígeno. Se recolectó sangre de las alpacas inmunizadas y se aislaron de la sangre linfocitos de sangre periférica. Se extrajo ARN de linfocitos de sangre periférica, y este ARN se sometió a transcripción inversa para obtener ADNc. Un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de un anticuerpo de cadena pesada se amplificó por un método de PCR utilizando el ADNc obtenido como molde. El fragmento de ADN amplificado se incorporó a un fagémido de forma que, cuando se empaquetara en un fago, la región variable del anticuerpo de cadena pesada se visualizaría en la superficie del fago, y este fagémido se introdujo en *Escherichia coli* por un método de electroporación. La *Escherichia coli* en la cual se introdujo el fagémido se infectó además con un fago auxiliar (M13K07) y, a continuación, se cultivó la *Escherichia coli* para liberar el fago en el fluido de cultivo. Después de finalizar el cultivo, se centrifugó el medio de cultivo para recolectar el sobrenadante del cultivo que contenía el fago. Este sobrenadante de cultivo que contenía los fagos recolectados se utilizó como biblioteca de fagos. La concentración de la biblioteca de fagos fue $3.36\times10^{13}$ PFU/mL.

[0122] [Ejemplo 4] Aislamiento de clones de fagos que expresan anticuerpos de cadena pesada anti-hTfR

Los fagos que expresan la región variable de un anticuerpo de cadena pesada que se une específicamente al hTfR (fago que expresa anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR) se clonaron a de la biblioteca de fagos producida en el ejemplo 3 por un método de biopanning. En general, la clonación se llevó a cabo del siguiente modo. La solución que contenía rhTfR producida en el ejemplo 2 se adicionó a cada pocillo de una placa de microtitulación, y el rhTfR se inmovilizó en la placa. A continuación, cada pocillo se lavó tres veces con una solución de PBST al 0.05 %, y después se adicionó un agente bloqueante a cada pocillo para bloquearlo. A continuación, cada pocillo se lavó tres veces con una solución de PBST al 0.05 % y se adicionó la biblioteca de fagos diluida con el agente de bloqueo. Se dejó reposar la placa para permitir que los fagos que llevaban el anticuerpo anti-hTfR de cadena pesada en la superficie se unieran al rhTfR. A continuación, cada pocillo se lavó

cinco veces con una solución de PBST al 0.05 % para eliminar los fagos que no se unían a rhTfR. A continuación, los fagos unidos a rhTfR se disociaron de rhTfR adicionando un eluyente ácido al mismo y se recolectaron como una solución.

[0123] La solución recolectada se diluyó y se adicionó a una solución que contenía *Escherichia coli*, y la Escherichia coli se infectó con los fagos. La *Escherichia coli* infectada con los fagos se infectó además con un fago auxiliar (M13K07) y, a continuación, se cultivó la Escherichia coli para liberar los fagos en el fluido de cultivo. Los fagos se purificaron utilizando una solución de PEG.

[0124] *Escherichia coli* se infectó con los fagos purificados y a continuación se sembró en un medio de agar. Se recolectaron las células de *Escherichia coli* que formaron una sola colonia en el medio, se siguieron cultivando en el medio y, a continuación, las células de *Escherichia coli* se infectaron con un fago auxiliar (M13K07) para liberar los fagos en el fluido de cultivo. Los fagos liberados en el fluido de cultivo se recolectaron designados como clones de fagos que expresan anticuerpos de cadena pesada anti-hTfR, en un sobrenadante de cultivo obtenido centrifugando cada fluido de cultivo. Cada clon de fago contenido en el sobrenadante del cultivo se purificó utilizando una solución de PEG.

[0125] [Ejemplo 5] Determinación de la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR expresado por cada clon de fago que expresa anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR.

Se seleccionaron cinco clones de fagos que expresan anticuerpos de cadena pesada anti-hTfR aislados en el ejemplo 4 y se nombraron clones 1 a 5, respectivamente. Se purificó un fagémido de cada clon, se determinó la secuencia de nucleótidos de la región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR codificada por cada fagémido purificado y, con base en ello, se determinó la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR expresada por cada clon (Tabla 1).

[0126] [Tabla 1]

Tabla 1 Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos de cadena pesada anti-hTfR expresados por los clones 1 a 5 (ejemplos de la secuencia de aminoácidos de cada CDR)

| Número de clon | Secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo de cadena pesada anti-hTfR |
|---|---|
| 1 | SEQ ID NO:3 |
| 2 | SEQ ID NO:4 |
| 3 | SEQ ID NO:5 |
| 4 | SEQ ID NO:6 |
| 5 | SEQ ID NO:7 |

[0127] Aquí, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID

NO:3 se denominó péptido de afinidad hTfR 1, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:4 se denominó péptido de afinidad hTfR 2, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5 se denominó péptido de afinidad hTfR 3, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:6 se denominó péptido de afinidad hTfR 4, y una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:7 se denominó péptido de afinidad hTfR 5. Cada uno de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 5 contiene CDR1 a CDR3. La secuencia de aminoácidos de cada una de las CDR se muestra en la Tabla 2. La secuencia de aminoácidos de la CDR del péptido de afinidad hTfR 5 ejemplificada en la Tabla 2 es idéntica a la del péptido de afinidad hTfR 3. En la Tabla 2, también se muestra conjuntamente la secuencia de aminoácidos de cada CDR del péptido de afinidad hTfR 6 que se describirá más adelante en el ejemplo 6.

[0128] [Tabla 2]

Tabla 2 Número de secuencia de la secuencia de aminoácidos contenida en las CDR1 a CDR3 de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 (ejemplos de secuencia de aminoácidos de cada CDR)

| Nombre | Secuencia de aminoácidos | | |
|---|---|---|---|
| | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
| Péptido de afinidad hTfR 1 | 8, 9 | 10, 11 | 12, 13 |
| Péptido de afinidad hTfR 2 | 14, 15 | 16, 17 | 18, 19 |
| Péptido de afinidad hTfR 3 | 20, 21 | 22, 23 | 24, 25 |
| Péptido de afinidad hTfR 4 | 26, 27 | 28, 29 | 30, 31 |
| Péptido de afinidad hTfR 5 | 20, 21 | 22, 23 | 24, 25 |
| Péptido de afinidad hTfR 6 | 20, 21 | 56, 57 | 24, 25 |

[0129] [Ejemplo 6] Producción de péptidos de afinidad hTfR 1 a 6

Se sintetizó artificialmente un fragmento de ADN que contiene un gen que codifica el péptido de afinidad hTfR 1 al cual se adicionó en el N-terminal una etiqueta peptídica establecida en la SEQ ID NO:54, y éste se incorporó entre el sitio MluI y el sitio NotI de un vector de expresión de mamíferos pCI-neo para obtener un vector de expresión del péptido de afinidad hTfR 1. Este vector de expresión se introdujo en células CHO-S utilizando un sistema de expresión ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto, y el péptido de afinidad hTfR 1 se expresó en las células CHO-S. Estas células expresan el péptido de afinidad hTfR 1 y secretan este péptido en

el fluido de cultivo. Estas células se cultivaron en presencia de neomicina de acuerdo con el protocolo adjunto. Específicamente, las células CHO-S se suspendieron en 15 mL de un medio de cultivo para tener una concentración de $6\times10^6$ células/mL, esta suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer que tiene un volumen de 150 mL, y las células se cultivaron durante un día a 37°C en un ambiente humidificado compuesto de 5 % de $CO_2$ y 95 % de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm. El líquido de alimentación y el líquido potenciador incluidos en el Sistema de Expresión ExpiCHO se adicionaron al cultivo, y las células se cultivaron durante 9 días a 32°C en un ambiente humidificado compuesto de 5 % de $CO_2$ y 95 % de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm, dejando que se exprese el péptido de afinidad hTfR 1. Después de finalizar el cultivo, se filtró un sobrenadante obtenido centrifugando el fluido de cultivo (3000 g, durante 5 minutos) a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Corporation), y se recolectó como sobrenadante del cultivo. El péptido de afinidad hTfR 1 se purificó del sobrenadante de cultivo recolectado por el método siguiente, y se obtuvo un producto refinado.

[0130] El sobrenadante de cultivo recolectado, 5 volúmenes de columna de solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) que contenía 150 mM de NaCl y 1 mM de $CaCl_2$ como solución de equilibrio se pasaron a través de una columna de gel de afinidad de agarosa Anti-FLAG M1 (Sigma-Aldrich Co., LLC). A continuación, el sobrenadante del cultivo se cargó en la columna y el péptido de afinidad hTfR 1 se adsorbió a la columna de afinidad. A continuación, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de la solución de equilibrio. El péptido de afinidad hTfR 1 se eluyó haciendo pasar un eluyente (solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) que contenía 150 mM de NaCl) a través de la columna. El péptido de afinidad hTfR 1 eluido se utilizó como producto purificado en los siguientes experimentos. Para los péptidos de afinidad hTfR 2 a 5, los productos purificados se obtuvieron de la misma manera que en el caso del péptido de afinidad hTfR 1. Además, se produjo por un método estándar un vector de expresión que codifica el péptido de afinidad hTfR 6 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:55, en la cual se había sustituido un aminoácido de CDR2 del péptido de afinidad hTfR 5, y se obtuvo un producto purificado del péptido de afinidad hTfR 6 utilizando este vector de expresión de la misma manera que en el caso de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 5.

[0131] [Ejemplo 7] Evaluación de la actividad de unión de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 hacia TfR de humano y TfR de mono

La medición de la actividad de unión de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 5 hacia el TfR de humano (hTfR) y el TfR de mono se llevó a cabo utilizando OctetRED96 (ForteBio, Inc., una división de Pall Corporation), el cual es un sistema de análisis de interacciones biomoleculares que utiliza interferometría de biocapa (BLI). Se describirán brevemente los principios básicos de la interferometría de biocapas. Cuando se proyecta luz de una longitud de onda específica sobre una capa de biomoléculas fijada en la superficie de un chip sensor, la luz se refleja en dos superficies, es

decir, de las superficies de la capa biomolecular y de la capa de referencia interna, y se crea una onda de interferencia de la luz. A medida que las moléculas en la muestra de medición se unen a las biomoléculas en la superficie del chip sensor, el grosor de la capa en la punta del sensor aumenta, dando como resultado un desplazamiento de longitud de onda que se produce en la onda de interferencia. Al medir el cambio en este desplazamiento de longitud de onda, se puede realizar en tiempo real la cuantificación del número de moléculas que se unen a las biomoléculas inmovilizadas en la superficie del chip sensor y el análisis cinético. En general, la medición se llevó a cabo de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto al OctetRED96. Como el TfR de humano, se utilizó un hTfR recombinante que tenía la secuencia de aminoácidos de la región extracelular del hTfR, del residuo de cisteína 89 desde el N-terminal hasta la fenilalanina en el C-terminal en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:1, con una etiqueta de histidina adicionada en el N-terminal (rhTfR, Sino Biological, Inc.). Como el TfR de mono, se utilizó un TfR de mono recombinante (r-monkey TfR, Sino Biological, Inc.) que tiene la secuencia de aminoácidos de la región extracelular del TfR de mono cynomolgus, del residuo de cisteína 89 desde el N-terminal hasta la fenilalanina en el C-terminal en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:2, con una etiqueta de histidina adicionada en el N-terminal.

[0132] Los productos purificados de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 obtenidos en el ejemplo 6 se diluyeron cada uno con HBS-P+ (10 mM HEPES que contenía 150 mM NaCl, 1 % de BSA, 50 μM de EDTA y 0.05 % de surfactante P20), y se prepararon soluciones con tres tipos de concentraciones de 10 a 40 nM. Estas soluciones se utilizaron como soluciones de muestra. El rhTfR y el TfR de mono r se diluyeron cada uno con HBS-P+, y se prepararon soluciones de 15 μg/mL, las cuales se utilizaron como solución de hTfR-ECD(Histag) y solución de TfR-ECD(Histag) de mono, respectivamente.

[0133] Cada una de las soluciones de muestra descritas anteriormente se dispensó en una placa negra de 96 pocillos (Greiner Bio-One GmbH) a 200 μL por pocillo. Además, la solución hTfR-ECD(Histag) y la solución TfR-ECD(Histag) de mono preparadas como se describió anteriormente se dispensaron cada una en pocillos predeterminados a 200 μL/pocillo. En los pocillos de la línea base, disociación y lavado, se dispensó HBS-P+ a 200 μL/pocillo. En los pocillos para la regeneración, se dispensó Glicina-HCl 10 mM (pH 1.7) a 200 μL/pocillo. En los pocillos para la activación, se dispensó una solución de $NiCl_2$ 0.5 mM que contenía 1 % de BSA a 200 μL/pocillo. Esta placa y un biosensor (Biosensor/Ni-NTA; ForteBio, Inc., una división de Pall Corporation) se colocaron en posiciones predeterminadas de OctetRED96.

[0134] OctetRED96 se operó bajo las condiciones mostradas en la siguiente Tabla 3 para adquirir datos, posteriormente las curvas de reacción de unión se ajustaron a un modelo de unión 1:1 o a un modelo de unión 2:1 utilizando el software de análisis adjunto a OctetRED96, las constantes de tasa de asociación (kon) y las constantes de tasa de disociación (koff) de cada uno

de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 para hTfR y TfR de mono se midieron para calcular las constantes de disociación ($K_D$). La medición se llevó a cabo a una temperatura de 25°C a 30°C.

[0135] [Tabla 3]

Tabla 3 Condiciones de operación para OctetRED96

| | Paso | Tiempo de contacto (s) | Tasa (rpm) | Valor de umbral |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Regeneración | 5 | 1000 | - |
| 2 | Lavado | 5 | 1000 | - |
| Los pasos 1 y 2 descritos anteriormente se repiten seis veces. | | | | |
| 3 | Activación | 60 | 1000 | 1.0 |
| 4 | Linea base 1 | 120 | 1000 | - |
| 5 | Carga | 600 | 1000 | - |
| 6 | Linea base 2 | 150 | 1000 | - |
| 7 | Asociación | 120 | 1000 | - |
| 8 | Disociación | 200 | 1000 | - |
| Hasta que se complete la medición de todas las muestras, se repiten los pasos 1 a 8. | | | | |

[0136] La tabla 4 muestra los resultados de medición de las constantes de tasa de asociación (kon), las constantes de tasa de disociación (koff) y las constantes de disociación ($K_D$) de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 para hTfR y TfR de mono. Con respecto a los péptidos de afinidad hTfR 1 y 2, no se obtuvieron los valores de $K_D$ para el TfR de mono. Con respecto a éstos, los valores de $K_D$ se midieron por separado utilizando la solución hTfR-ECD(Histag) y la solución TfR-ECD(Histag) de mono producida en el ejemplo 2 y utilizando Biacore. Como resultado, los valores de $K_D$ del péptido de afinidad hTfR 1 para el TfR de mono y el TfR de humano se midieron en $1.76\times10^{-8}$ y $1.65\times10^{-8}$, respectivamente. Además, los valores de $K_D$ del péptido de afinidad hTfR 2 para el TfR de mono y el TfR de humano se midieron en $1.76\times10^{-8}$ y $1.65\times10^{-8}$, respectivamente. Estos resultados indican que el valor de KD de cada péptido de afinidad hTfR con el TfR de mono es de aproximadamente $1.0\times10^{-8}$ a $5.0\times10^{-5}$, y el valor de $K_D$ con el TfR de humano es de aproximadamente $1.0\times10^{-8}$ a $1.0\times10^{-7}$.

[0137] [Tabla 4]

Tabla 4 Afinidad de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 para hTfR y TfR de mono

| Nombre | Especies animales | kon (1/Ms) | koff (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|
| Péptido de afinidad hTfR 1 | Mono | N/A | N/A | N/A |
| | Humano | $2.80\times10^{5}$ | $2.71\times10^{-2}$ | $9.70\times10^{-8}$ |
| Péptido de | Mono | N/A | N/A | N/A |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| afinidad hTfR 2 | Humano | $2.37\times10^{5}$ | $1.46\times10^{-2}$ | $6.14\times10^{-8}$ |
| Péptido de afinidad hTfR 3 | Mono | $1.15\times10^{6}$ | $1.23\times10^{-2}$ | $1.07\times10^{-8}$ |
| | Humano | $5.71\times10^{5}$ | $6.00\times10^{-3}$ | $1.05\times10^{-8}$ |
| Péptido de afinidad hTfR 4 | Mono | $3.18\times10^{5}$ | $3.16\times10^{-3}$ | $9.92\times10^{-9}$ |
| | Humano | $2.27\times10^{5}$ | $2.70\times10^{-3}$ | $1.19\times10^{-8}$ |
| Péptido de afinidad hTfR 5 | Mono | $3.96\times10^{5}$ | $6.95\times10^{-3}$ | $1.75\times10^{-8}$ |
| | Humano | $4.07\times10^{5}$ | $5.62\times10^{-3}$ | $1.38\times10^{-8}$ |
| Péptido de afinidad hTfR 6 | Mono | N/A | N/A | N/A |
| | Humano | $4.28\times10^{5}$ | $5.86\times10^{-2}$ | $1.37\times10^{-7}$ |

[0138] De los resultados descritos anteriormente, se calculó el valor relativo de la constante de disociación con el TfR de mono en el caso donde el valor de la constante de disociación de cada péptido de afinidad hTfR para el hTfR se tomó como 1, (Tabla 5). Todos los valores relativos de los péptidos de afinidad hTfR estuvieron en el intervalo de 0.8 a 2.5. Estos resultados indican que la afinidad por el hTfR se aproxima a la afinidad por el TfR de mono. En particular, para otros péptidos de afinidad hTfR, excepto para el péptido de afinidad hTfR 2, los valores relativos estaban en el intervalo de 0.8 a 1.3, y esto indica que la afinidad por el hTfR se aproxima muy altamente a la afinidad por el TfR de mono. Por lo tanto, se predice naturalmente que la farmacocinética de todos estos péptidos de afinidad hTfR (en particular, los péptidos de afinidad hTfR 1 y 3 a 5) en los cuerpos vivos de monos cuando se administran a monos, se aproximan muy altamente a la farmacocinética cuando se administran a humanos, y, por lo tanto, en el caso donde un medicamento es desarrollado utilizando éstos, algunos de los estudios no clínicos tales como pruebas farmacocinéticas del medicamento se pueden llevar a cabo utilizando monos, lo cual puede acelerar significativamente el desarrollo del medicamento.

[0139] [Tabla 5]

Tabla 5 Valores relativos de los péptidos de afinidad hTfR 1 a 6 para el TfR de mono

| Nombre | Valor relativo |
|---|---|
| Péptido de afinidad hTfR 1 | 1.06 |
| Péptido de afinidad hTfR 2 | 2.36 |
| Péptido de afinidad hTfR 3 | 1.02 |
| Péptido de afinidad hTfR 4 | 0.83 |
| Péptido de afinidad hTfR 5 | 1.27 |
| Péptido de afinidad hTfR 6 | N/A |

[0140] [Ejemplo 8] Producción del vector de expresión del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab

El vector de expresión de mamíferos pCI-neo (Promega Corporation) se digirió con MluI y NotI. Un fragmento de ADN que tiene un sitio MluI en el lado 5' y un sitio NotI en el lado 3' de un gen

que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:47 que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 42, en la cual el péptido de afinidad hTfR 1 está unido al C-terminal de la cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:38, por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:69, fue sintetizada artificialmente. Se digirió con MluI y NotI y se incorporó entre el sitio MluI y el sitio NotI del vector de expresión de mamíferos pCI-neo, y se produjo un vector de expresión de una proteína en la cual se unieron el péptido de afinidad hTfR 1 y la cadena pesada de trastuzumab. Este vector de expresión se nombró pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1). Del mismo modo, también para los péptidos de afinidad hTfR 2 a 5, se sintetizaron artificialmente fragmentos de ADN que contenían cada uno un gen que codificaba una proteína en la cual se unían uno de los péptidos y la cadena pesada de trastuzumab. Estos fragmentos de ADN se digirieron cada uno con MluI y NotI y se incorporaron entre el sitio MluI y el sitio NotI del vector de expresión pCI-neo de mamíferos, y se produjeron vectores de expresión de proteínas en los cuales se unió cualquiera de los péptidos de afinidad hTfR 2 a 5 y la cadena pesada de trastuzumab. Los vectores de expresión producidos se nombraron pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(2) a pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(5), respectivamente.

[0141] Además, un fragmento de ADN que tiene un sitio MluI en el lado 5' y un sitio NotI en el lado 3' de un gen que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:48 que codifica la cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 41, se sintetizó artificialmente, se digirió con MluI y NotI y se ligó al Vector de Expresión PCI-neo de Mamíferos (Promega Corporation) previamente preparado que había sido digerido con MluI y NotI, para construir un vector de expresión para la cadena ligera de trastuzumab. Este vector de expresión se nombró pCI-neo-Trastuzumab(LC).

[0142] [Ejemplo 9] Producción del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab

El pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1) y el pCI-neo-Trastuzumab(LC) producidos en el ejemplo 8 se introdujeron simultáneamente en células CHO-S utilizando un sistema de expresión ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto, y se coexpresaron en las células CHO-S una proteína en la cual estaban unidos el péptido de afinidad hTfR 1 y la cadena pesada de trastuzumab, y la cadena ligera de trastuzumab. Estas células expresan la proteína en la cual se fusionan un péptido de afinidad hTfR y trastuzumab, y secretan esta proteína en el fluido de cultivo. En lo sucesivo, esta proteína de fusión se denominará péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1. Estas células se cultivaron en presencia de neomicina de acuerdo con el protocolo adjunto. Más específicamente, las células CHO-S se suspendieron en 15 mL de un medio de cultivo para tener una concentración de $6\times10^6$ células/mL, esta suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer que tiene un volumen de 150 mL, y a continuación las células se cultivaron durante un día a 37°C en un ambiente humidificado compuesto de 5 % de $CO_2$ y 95 % de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm. El líquido de alimentación y el líquido potenciador incluidos en el Sistema

de Expresión ExpiCHO se adicionaron al cultivo, y las células se cultivaron durante 9 días a 32°C en un ambiente humidificado compuesto de 5 % de $CO_2$ y 95 % de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm, y se expresó el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1. Después del cultivo, el sobrenadante obtenido centrifugando el fluido de cultivo (3000 g, durante 5 minutos) se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Corporation), y se recolectó como sobrenadante del cultivo.

[0143] Se equilibró una columna abierta empaquetada con 1 mL de MabSelect SuRe LX (Cytiva, Inc.) haciendo pasar 5 volúmenes de columna de solución amortiguadora HEPES 25 mM (pH 7.5) que contenía 50 mM de NaCl a través de la columna. A continuación, el sobrenadante del cultivo se cargó en la columna y el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1 se unió a la resina. La columna se lavó haciendo pasar 5 volúmenes de columna de solución amortiguadora HEPES 25 mM (pH 7.5) que contenía 50 mM de NaCl a través de la columna y, a continuación, el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1 se eluyó haciendo pasar 150 mM de glicina (pH 3.0) que contenía 100 mM de NaCl a través de la columna. Se adicionó una cantidad equivalente a 5 % de Tris-HCl 1M (pH 8.0) al eluato que contenía el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1 para ajustar el pH a la neutralidad. Esto se sometió a intercambio de amortiguador utilizando una columna PD-10 (Cytiva, Inc.) para reemplazar el disolvente con PBS(-). La solución obtenida se utilizó en los siguientes experimentos como producto purificado del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1.

[0144] De forma similar al pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1), se introdujeron pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(2) a pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(5) en células CHO-S simultáneamente con pCI-neo-Trastuzumab(LC), y cada una de las proteínas en las cuales se unieron los péptidos de afinidad hTfR 2 a 5 y la cadena pesada de trastuzumab, y la cadena ligera de trastuzumab se coexpresaron en las células CHO-S. Estas células expresan una proteína en la cual están fusionados cualquiera de los péptidos de afinidad hTfR 2 a 4 y trastuzumab, y secretan esta proteína en el fluido de cultivo. En lo sucesivo, las proteínas de fusión expresadas por estas células se denominarán péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 2 a 5. Además, los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5 se denominará colectivamente péptido de afinidad hTfR-trastuzumab. Para los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 2 a 5 también, se obtuvieron productos purificados de la misma manera que en el caso del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1.

[0145] [Ejemplo 10] Evaluación de la actividad de unión del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab hacia TfR de humano y TfR de mono.

La afinidad de los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5 producidos en el ejemplo 9 por el hTfR y el TfR de mono se investigó de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 7. La tabla 6 muestra los resultados de medición de las constantes de tasa de asociación (kon), las constantes de tasa de disociación (koff) y las constantes de disociación ($K_D$) del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5 para hTfR y TfR de mono.

[0146] [Tabla 6]

Tabla 6 Afinidad de los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5 para hTfR y TfR de mono

| Nombre | Especies animales | kon (1/Ms) | koff (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1 | Mono | $5.72\times10^{6}$ | $4.92\times10^{-4}$ | $8.61\times10^{-10}$ |
| | Humano | $4.73\times10^{5}$ | $2.26\times10^{-4}$ | $4.77\times10^{-10}$ |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 2 | Mono | $6.59\times10^{5}$ | $1.61\times10^{-3}$ | $2.45\times10^{-9}$ |
| | Humano | $4.74\times10^{5}$ | $4.95\times10^{-4}$ | $1.04\times10^{-9}$ |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 3 | Mono | $5.74\times10^{5}$ | $1.24\times10^{-4}$ | $2.15\times10^{-10}$ |
| | Humano | $5.25\times10^{5}$ | $1.63\times10^{-4}$ | $3.12\times10^{-10}$ |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 4 | Mono | $5.13\times10^{5}$ | $8.45\times10^{-5}$ | $1.65\times10^{-10}$ |
| | Humano | $4.99\times10^{5}$ | $6.19\times10^{-5}$ | $1.24\times10^{-10}$ |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 | Mono | $5.41\times10^{5}$ | $1.24\times10^{-4}$ | $2.29\times10^{-10}$ |
| | Humano | $4.78\times10^{5}$ | $1.18\times10^{-4}$ | $2.47\times10^{-10}$ |

[0147] Como resultado de la medición de la actividad de unión de los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab hacia el hTfR, para todos los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab, la constante de disociación ($K_D$) con el hTfR fue de $1\times10^{-9}$ M a $1\times10^{-10}$ M. Además, la constante de disociación con el TfR de mono también fue similar de $1\times10^{-9}$ M a $1\times10^{-10}$ M. Estos resultados muestran que estos péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab mantienen la afinidad tanto para el hTfR como para el TfR de mono, incluso cuando se fusionan con otras proteínas.

[0148] De los resultados descritos anteriormente, se calculó el valor relativo de la constante de disociación con el TfR de mono en el caso donde la constante de disociación de cada péptido de afinidad hTfR-trastuzumab con el hTfR se tomó como 1 (Tabla 7). Todos los valores relativos de los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab estaban en el intervalo de 0.9 a 2.5. Estos resultados indican que la afinidad de cada péptido de afinidad hTfR-trastuzumab por el hTfR se aproxima a la afinidad por el TfR de mono. En particular, para cada uno de los péptidos de afinidad hTfR distintos del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 2, los valores relativos estaban en el intervalo de 0.8 a 1.9, y esto indica que la afinidad por el hTfR se aproxima muy altamente a la afinidad por el TfR de mono. Por lo tanto, se predice naturalmente que la farmacocinética de cada uno de estos péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab (en particular, cada uno de los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 y 3 a 5) en los cuerpos vivos de los monos cuando se administran a los monos, se aproximan muy altamente a la farmacocinética cuando se administran a los seres humanos, y, por lo tanto, en el caso donde

un medicamento es desarrollado utilizando estos, algunos de los estudios no clínicos tales como las pruebas farmacocinéticas del medicamento se pueden llevar a cabo utilizando monos, lo cual puede acelerar significativamente el desarrollo del medicamento.

[0149] [Tabla 7]

Valores relativos de afinidad de los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5 por el TfR de mono

| Nombre | Valor relativo |
|---|---|
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1 | 1.81 |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 2 | 2.36 |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 3 | 0.69 |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 4 | 1.33 |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 | 0.93 |

[0150] [Ejemplo 11] Evaluación 1 de la migración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab al cerebro utilizando un ratón knock-in hTfR

A continuación, se evaluó si los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5 atraviesan la BBB y migran al cerebro cuando se inyectan por vía intravenosa, utilizando el ratón knock-in hTfR (ratón hTfR-KI) en el cual el gen que codifica la región extracelular del receptor de transferrina de ratón había sido sustituido por un gen que codifica la región extracelular del gen del receptor de transferrina humano. El ratón hTfR-KI se produjo generalmente por el método siguiente.

[0151] Se sintetizó químicamente un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:51, en la cual un gen de resistencia a la neomicina flanqueado por secuencias loxP se dispuso en el lado 3' de un ADNc que codifica un hTfR quimérico cuya región intracelular tenía la secuencia de aminoácidos del hTfR de ratón y cuya región extracelular tenía la secuencia de aminoácidos del hTfR de humano. Este fragmento de ADN se incorporó a un vector diana que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:52 como secuencia de brazo 5' y una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:53 como secuencia de brazo 3', por un método estándar, y esto se introdujo en células ES de ratón por un método de electroporación. Las células ES de ratón después de la transfección génica se sometieron a cultivo selectivo en presencia de neomicina, y se seleccionaron las células ES de ratón en las cuales el vector diana se había incorporado al cromosoma por recombinación homóloga. Las células ES de ratón recombinantes obtenidas se inyectaron en embriones de ratón ICR en estadio de 8 células (embriones huésped), y los embriones se trasplantaron a ratones pseudopreñados (ratones receptores) obtenidos por apareamiento con ratones con vasectomía. La descendencia obtenida (ratones quiméricos) se juzgó por el color de su pelo, y se seleccionaron los individuos en los cuales las células ES habían contribuido a la formación del organismo con alta eficiencia, es decir, los individuos que tenían una alta proporción de pelo blanco con respecto a la totalidad del pelo. Estos ratones quiméricos se cruzaron con un ratón ICR para obtener ratones F1. Se seleccionaron ratones

F1 blancos, se analizó el ADN extraído del tejido de la cola y se designó como ratón hTfR-KI a un ratón en el cual el gen del receptor de transferrina del ratón había sido reemplazado por el hTfR quimérico en el cromosoma.

[0152] Cada uno de los productos purificados de los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5 obtenidos en el ejemplo 9 se administraron por vía intravenosa a dos ratones machos hTfR-KI a una dosis de 5 mg/kg. Además, como control negativo, se administró trastuzumab por vía intravenosa a dos ratones machos hTfR-KI a una dosis de 5 mg/kg. Después de 6 y 24 horas de la administración, los ratones se sometieron a eutanasia y a perfusión de todo el cuerpo con solución salina fisiológica, y se recolectaron los cerebros (parte que incluía el cerebro y el cerebelo). Se midieron los pesos (peso húmedo) de los cerebros extirpados, posteriormente cada uno de los cerebros se dividió en el plano sagital, y una mitad del cerebro se utilizó para medir la concentración de los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5 en el tejido, mientras que la otra mitad se sometió a tinción inmunohistoquímica.

[0153] El tejido cerebral para la medición de la concentración se homogeneizó en T-PER (Thermo Fisher Scientific, Inc.) que contenía un cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich Co., LLC). El homogeneizado obtenido se centrifugó (3000 g, 5 min) y se recolectó el sobrenadante. Las cantidades del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab y trastumab contenidas en el sobrenadante del homogeneizado se midieron por el método siguiente. En primer lugar, se mezclaron cantidades iguales de SULFO-Goat Anti Human IgG (h+l) (Bethyl Laboratories, Inc.) (0.5 μg/mL) y Goat Anti Human Kappa Light chain-biotin (IBL) (0.5 μg/mL), se dispensó la mezcla en una placa de muestreo en porciones de 25 μL y se agitó la placa de muestreo con un mezclador de microplacas a temperatura ambiente durante 1 hora para preparar las soluciones de reacción. Se adicionó amortiguador de bloqueo SuperBlock en PBS a una placa Streptavidin Gold (Meso Scale Diagnostics, LLC) en porciones de 150 μL, y se bloqueó la placa agitándola con un mezclador de microplacas a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBST, posteriormente se adicionó la solución de reacción en partes de 25 μL, y la placa se agitó con un mezclador de microplacas a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se adicionaron 150 μL de amortiguador de lectura T (Meso Scale Diagnostics, LLC) a cada pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia de cada pocillo utilizando el lector SectorTM Imager 6000. La cantidad de péptido de afinidad hTfR-trastuzumab contenida por gramo de peso (peso húmedo) de cerebro (concentración de péptido de afinidad hTfR-trastuzumab en tejido cerebral) se calculó creando una curva de calibración de los valores medidos de muestras estándar del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab a concentraciones conocidas, e interpolando el valor medido de cada espécimen en esta curva de calibración. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

[0154] [Tabla 8]

Tabla 8 Concentración de los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5 en el tejido cerebral

| Nombre | Concentración en el tejido cerebral (μg/g·de tejido) | |
|---|---|---|
| | Después de 6 horas de la administración | Después de 24 horas de la administración |
| Trastuzumab | 0.07 | 0.04 |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 1 | 0.13 | 0.07 |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 2 | 0.23 | 0.17 |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 3 | 0.37 | 0.15 |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 4 | 0.42 | 0.33 |
| Péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 | 0.33 | 0.16 |

[0155] Todos los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab mostraron valores superiores de la concentración en el tejido cerebral tanto después de 6 horas como después de 24 horas de la administración, en comparación con el grupo de control negativo. Estos resultados indican que los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab tienen la propiedad de acumular la BBB en el tejido cerebral.

[0156] [Ejemplo 12] Evaluación 2 de la migración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab al cerebro utilizando un ratón knock-in hTfR

La tinción inmunohistoquímica del péptido de afinidad hTfR en el tejido cerebral se realizó generalmente por el procedimiento siguiente. El tejido cerebral recolectado para la tinción inmunohistoquímica se sumergió en compuesto OCT (Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) y se congeló rápidamente a -80°C utilizando Histo-Tek PINO (Sakura Finetek Japan Co., Ltd.), y se produjo un bloque de tejido congelado. Este bloque congelado se cortó a un grosor de 4 μm, y el corte de tejido se pegó a un portaobjetos de vidrio recubierto de MAS (Matsunami Glass Industry, Ltd.). El portaobjetos de vidrio se sumergió en paraformaldehído al 4 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 4 °C durante 5 minutos, y se fijó el espécimen. A continuación, se sumergió el portaobjetos de vidrio en PBS que contenía 1 % de BSA para bloqueo. A continuación, se dejó caer sobre el corte de tejido un anticuerpo de cadena ligera y pesada anti hIgG de cabra debidamente diluido (Bethyl Laboratories, Inc.) y se dejó reaccionar durante 1 hora. A continuación, se dejó caer sobre el corte de tejido la solución de trabajo de amplificación de fluoresceína incluida en el kit de fluorescencia TSA-Plus (PerkinElmer, Inc.) y se dejó reaccionar durante 15 minutos en la oscuridad. A continuación, se dejó caer sobre el corte de tejido el Anti-Fluorescein-HRP incluido en el CSA II Biotin-Free Tyramide Signal Amplification System (Dako A/S) y se dejó reaccionar durante 15 minutos. A

continuación, el corte de tejido se hizo reaccionar con sustrato DAB (3,3'-diaminobencidina, Vector Laboratories, Inc.) para desarrollar el color. A continuación, el corte de tejido se contrateñía con hematoxilina de Mayer (Merck & Co., Inc.), se deshidrataba, se hacía transparente y se encerraba, y el resultado se observaba bajo un microscopio óptico.

[0157] La Figura 1 son fotografías ópticas de cortes de tejido teñidos 6 horas después de la administración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab, y la Figura 2 son fotografías ópticas de cortes de tejido teñidos 24 horas después de la administración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab. En el tejido cerebeloso del ratón administrado con trastuzumab como control negativo, no se reconoció ninguna tinción tanto 6 horas como 24 horas después de la administración, lo cual demostró que el trastuzumab inyectado por vía intravenosa no llegaba al parénquima cerebral cerebeloso, y que casi no había tinción de fondo (Figura 1 panel (a) y Figura 2 panel (a)). Por otra parte, en el tejido cerebeloso del ratón administrado con los péptidos de afinidad hTfR-trastuzumab 1 a 5, se reconoció la tinción en el parénquima cerebral tanto 6 horas como 24 horas después de la administración, lo cual demostró que el trastuzumab inyectado por vía intravenosa llegó el parénquima cerebral cerebeloso (Figura 1 panel (b) a Figura 1 panel (f) y Figura 2 panel (b) a Figura 2 panel (f)). En particular, en el tejido cerebeloso del ratón administrado con el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 3, se reconoció la tinción en el parénquima cerebral tanto 6 horas como 24 horas después de la administración, lo cual demostró que el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 3 inyectado por vía intravenosa llegó eficientemente al parénquima cerebral cerebeloso (Figura 1 panel (e) y Figura 2 panel (e)).

[0158] [Ejemplo 13] Evaluación de la migración del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab al cerebro utilizando mono cynomolgus

Un producto purificado del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 obtenido en el ejemplo 9 y trastumab se administraron cada uno una vez por vía intravenosa a un mono cynomolgus macho (Macaca fascicularis) a una dosis de 5 mg/kg. Además, como control, se administró por vía intravenosa el mismo volumen de solución salina fisiológica a un mono cynomolgus macho. Se recolectó sangre periférica 20 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 8 horas después de la administración, se midieron las concentraciones del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 y trastuzumab contenidas en la sangre periférica por el método descrito en el ejemplo 11, y se calcularon Cmáx (μg/mL), AUCO-8h (μg/h/mL) y t1/2β (h) de los valores medidos. La Cmáx (μg/mL), AUCO-8h (μg/h/mL) y t1/2β (h) del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 fueron 142, 816 y 25.1, respectivamente. Por otra parte, la Cmáx (μg/mL), AUCO-8h (μg/h/mL) y t1/2β (h) de trastuzumab fueron 110, 509 y 2.27, respectivamente. Estos resultados indican que el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 es relativamente estable en la sangre cuando se administra por vía intravenosa a un mono cynomolgus.

[0159] Ocho horas después de la administración, los monos cynomolgus fueron sometidos a perfusión de todo el cuerpo con solución salina fisiológica. Después de la perfusión, se extrajo

tejido cerebral, incluyendo la médula oblonga y diversos órganos. Las concentraciones del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 y trastuzumab contenidas en estos tejidos cerebrales extraídos y diversos órganos se midieron por el método descrito en el ejemplo 11.

[0160] Con respecto al tejido cerebral, éste tejido se dividió en corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, mesencéfalo, puente de Varolio, médula oblonga, núcleo caudado, putamen, globo pálido, tálamo, hipotálamo, médula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar, y se realizaron mediciones en cada uno de ellos. Además, con respecto a los diversos órganos, se recolectaron retina, hígado, riñones, corazón (ventrículo izquierdo), corazón (válvula aórtica), pulmones, médula ósea, bazo, timo, testículos, próstata, músculo recto femoral, EDL, músculo sóleo, tríceps y diafragma, y se realizaron mediciones en cada uno de ellos.

[0161] La Figura 3 muestra los resultados de medición del tejido cerebral. En corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, mesencéfalo, puente de Varolio, médula oblonga, núcleo caudado, putamen, globo pálido y tálamo, apenas se detectó trastumab; sin embargo, el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 se detectó en concentraciones extremadamente altas en estos órganos en comparación con trastumab. Además, también en el hipotálamo se detectó el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 a una concentración más de dos veces la concentración de trastumab. Por otra parte, en la médula espinal cervical, la médula espinal torácica y la médula espinal lumbar, el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 se detectó en concentraciones más bajas que trastumab. En la retina, el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 y el trastumab se detectaron casi a la misma concentración. Estos resultados indican que el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 administrado por vía intravenosa a monos cynomolgus atraviesa la barrera hematoencefálica uniéndose a la transferrina presente en las células endoteliales cerebrovasculares, y llega a los tejidos del sistema nervioso central, tales como corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, mesencéfalo, puente de Varolio, médula oblonga, núcleo caudado, putamen, globo pálido y tálamo.

[0162] La Figura 4 muestra los resultados de medición de diversos órganos. En el corazón, donde se expresa la proteína HER2, la cual es una molécula diana del trastumab, se detectó trastumab en concentraciones altas, y en la médula ósea, donde el nivel de expresión del receptor de transferrina es alto, se detectó en concentraciones altas el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5. Esto indica que el péptido de afinidad hTfR-trastuzumab 5 administrado por vía intravenosa a monos cynomolgus llega a múltiples órganos, incluyendo hígado, riñones, corazón, pulmones, médula ósea, bazo, testículos y próstata.

[0163] [Ejemplo 14] Producción del vector de expresión del péptido de afinidad hTfR-hIDS

pD2535nt-HDP_v2 (HORIZON Discovery Group plc) se digirió con PacI y PmeI. Un fragmento de ADN que tiene un sitio PacI en el lado 5' y un sitio PmeI en el lado 3' de un gen que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:61 que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 60, en la cual el péptido de afinidad hTFR 6 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:55 está unido al N-terminal

de hIDS que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:58 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:59, fue sintetizada artificialmente. Éste se digirió con PacI y PmeI y se incorporó entre un sitio PacI y un sitio PmeI de pD2535nt-HDP_v2. El vector obtenido se designó como vector de expresión VHH6-GS3-hIDS. Además, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:60, la cual está codificada por este vector de expresión, se designó como VHH6-GS3-hIDS.

[0164] pD2535nt-HDP_v2 (HORIZON Discovery Group plc) se digirió con PacI y PmeI. Un fragmento de ADN que tiene un sitio PacI en el lado 5' y un sitio PmeI en el lado 3' de un gen que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:63 que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 62, en la cual el péptido de afinidad hTFR 5 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:7 está unido al N-terminal de hIDS que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:58 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:59, fue sintetizada artificialmente. Éste se digirió con PacI y PmeI y se incorporó entre un sitio PacI y un sitio PmeI de pD2535nt-HDP_v2. El vector obtenido se designó como vector de expresión VHH5-GS3-hIDS. Además, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:62, la cual está codificada por este vector de expresión, se designó como VHH5-GS3-hIDS.

[0165] pD2535nt-HDP_v2 (HORIZON Discovery Group plc) se digirió con PacI y PmeI. Un fragmento de ADN que tiene un sitio PacI en el lado 5' y un sitio PmeI en el lado 3' de un gen que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:65 que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:64, en la cual el péptido de afinidad hTFR 5 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 7 está unido al N-terminal de hIDS que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:58 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:59, y el péptido de afinidad 5 de hTFR está unido además al N-terminal de este péptido de afinidad hTFR 5 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como GS, fue sintetizado artificialmente. Éste se digirió con PacI y PmeI y se incorporó entre un sitio PacI y un sitio PmeI de pD2535nt-HDP_v2. El vector obtenido se designó como vector de expresión VHH5-Tandem-GS3-hIDS. Además, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:64, la cual está codificada por este vector de expresión, fue designada como VHH5-Tandem-GS3-hIDS.

[0166] [Ejemplo 15] Producción del péptido de afinidad hTfR-hIDS

Las células CHO knockout GS (células HD-BIOP3) se transformaron por la introducción del vector de expresión VHH5-GS3-hIDS producido en el ejemplo 14 utilizando una plataforma de expresión CHO knockout glutamina sintetasa (GS) (HORIZON Discovery Group plc) de acuerdo con el protocolo adjunto, y VHH5-GS3-hIDS se expresó en células HD-BIOP3. El pD2535nt-HDP_v2 incorpora el gen GS como marcador de selección, lo que permite transfectar un gen en células HD-

BIOP3 y posteriormente seleccionar en un medio libre de glutamina. Además, también es posible proporcionar una presión de selección superior a las células utilizando un medio que contiene una concentración baja (hasta 50 μmol/L) de MSX. En general, la transformación celular se llevó a cabo por el método siguiente. Las células HD-BIOP3 se suspendieron en 15 mL de medio Dynamis (Thermo Fisher Scientific, Inc.) suplementado con L-glutamina a 4 mM, hasta una concentración de $1\times10^6$ células/mL, y esta suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer que tenía un volumen de 150 mL. Una solución obtenida mezclando 37.5 μL de reactivo FreeStyle MAX (Thermo Fisher Scientific, Inc.) con 600 μL de OptoPro SFM (Thermo Fisher Scientific, Inc.), se mezcló con una solución obtenida disolviendo 37.5 μg de vector de expresión VHH5-GS3-hIDS en 600 μL de OptoPro SFM, y toda la cantidad de esta mezcla se adicionó a la suspensión celular. Las células se cultivaron durante 2 días a 37°C en un ambiente humidificado compuesto por 5 % de $CO_2$ y 95 % de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm, y a continuación las células se sometieron a un cultivo selectivo en medio Dynamis que contenía MSX a 25 μM o 35 μM. Las células HD-BIOP3 obtenidas por cultivo selectivo expresan VHH5-GS3-hIDS y lo secretan en el fluido de cultivo. Estas células se suspendieron en 200 mL de medio Dynamis hasta una concentración de $3\times10^5$ células/mL, esta suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer que tenía un volumen de 1000 mL, y las células se cultivaron durante 7 días a 37°C en un ambiente humidificado compuesto por un 5 % de $CO_2$ y un 95 % de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm, para expresar VHH5-GS3-hIDS. Al tercer y quinto día después del inicio del cultivo, se adicionaron 10 mL de EfficientFeed™ C+ 2X Supplement (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Después del cultivo, el sobrenadante obtenido centrifugando el fluido de cultivo (3000 g, durante 5 minutos) se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Corporation), y se recolectó como sobrenadante del cultivo.

[0167] Se equilibró una columna abierta empaquetada con 1 mL de MabSelect Xtra (Cytiva, Inc.) haciendo pasar 5 volúmenes de columna de solución amortiguadora HEPES 25 mM (pH 7.5) que contenía 50 mM de NaCl a través de la columna. A continuación, el sobrenadante del cultivo se cargó en la columna, y VHH5-GS3-hIDS se unió a la resina. La columna se lavó haciendo pasar 5 volúmenes de columna de solución amortiguadora HEPES 25 mM (pH 7.5) que contenía 50 mM de NaCl a través de la columna, y luego se eluyó VHH5-GS3-hIDS haciendo pasar 150 mM de Glicina (pH 3.0) que contenía 100 mM de NaCl a través de la columna. Se adicionó una cantidad equivalente al 5 % de Tris-HCl 1M (pH 8.0) al eluato que contenía el VHH5-GS3-hIDS para ajustar el pH a la neutralidad. A continuación, se realizó la ultrafiltración utilizando una membrana de celulosa regenerada Ultracel-30 (tamaño de poro: 30 kDa, Merck & Co., Inc.), y el filtrado se concentró hasta que el volumen de líquido fuera de aproximadamente 1 mL.

[0168] El líquido concentrado descrito anteriormente se cargó en una columna de exclusión por tamaño, columna Superdex 200 aumento 10/300 GL (volumen de columna: 24 mL, altura del lecho: 30 cm, Cytiva, Inc.), la cual se había equilibrado con 1.5 volúmenes de columna de solución

amortiguadora de Tris 20 mM (pH 7.4) que contenía 300 mM de NaCl, a una tasa de flujo constante de 0.5 mL/min, y se siguió suministrando la misma solución amortiguadora a la misma tasa de flujo. En ese momento, se dispuso un espectrofotómetro de absorción para la medición continua de la absorbancia del eluato en la trayectoria de flujo del eluato de la columna de exclusión por tamaño, se monitoreó la absorbancia a 280 nm y se recolectó una fracción que mostraba un pico de absorción a 280 nm como fracción que contenía VHH5-GS3-hIDS. A continuación, el amortiguador se intercambió con una solución amortiguadora de Tris 20 mM (pH 7.4) que contenía 50 mM de NaCl utilizando una membrana de celulosa regenerada Ultracel-30, y un líquido concentrado así obtenido se designó como producto purificado de VHH5-GS3-hIDS.

[0169] También para la VHH6-GS3-hIDS, se obtuvo un producto purificado de VHH6-GS3-hIDS por un método similar al de VHH5-GS3-hIDS, del sobrenadante de un cultivo obtenido cultivando células HD-BIOP3 en las cuales se había introducido un vector de expresión VHH6-GS3-hIDS. Además, también para VHH5-Tandem-GS3-hIDS, se obtuvo un producto purificado de VHH5-Tandem-GS3-hIDS por un método similar al de VHH5-GS3-hIDS, del sobrenadante de un cultivo obtenido cultivando células HD-BIOP3 en las cuales se había introducido un vector de expresión VHH5-Tandem-GS3-hIDS. Tres tipos de proteínas, a saber, VHH5-GS3-hIDS, VHH6-GS3-hIDS, y VHH5-Tandem-GS3-hIDS, se denominaron colectivamente péptido de afinidad hTfR-hIDS.

[0170] [Ejemplo 16] Evaluación de la actividad de unión del péptido de afinidad hTfR-hIDS al TfR de humano y TfR de mono

Con respecto a las proteínas de VHH5-GS3-hIDS, VHH6-GS3-hIDS y VHH5-Tandem-GS3-hIDS obtenidas por métodos estándar utilizando células CHO, se midió la actividad de unión al receptor de transferrina humano (hTfR) por un método ELISA. En general el método ELISA se llevó a cabo por el método siguiente. Un hTfR recombinante que contenía la región extracelular del hTfR, el cual contenía la secuencia de aminoácidos desde el N-terminal hasta el residuo 89 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:1, se diluyó con una solución amortiguadora de bicarbonato de hidrógeno 0.05 M (pH 9.6) hasta una concentración de 10 μg/mL, se adicionaron 100 μL de la dilución a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc A/S), y se dejó reposar la placa durante al menos una hora a temperatura ambiente para permitir que el anticuerpo se adsorbiera a la placa. A continuación, se adicionaron 300 μL de TBS que contenía 1 % de BSA y 0.05 % de Tween 20 a cada pocillo, y se dejó reposar la placa durante una hora a temperatura ambiente. Cada pocillo se lavó tres veces con TBS que contenía 0.05 % de Tween 20 (TBS-T), posteriormente VHH5-GS3-hIDS se diluyó a 100, 33.33, 11.11, 3.71, 1.24, 0.41, y 0.14 nM, VHH6-GS3-hIDS se diluyó a 333, 111, 37, 12. 33, 4.11, 1.37, y 0.46, y VHH5-Tandem-GS3-hIDS se diluyó a 1, 0.33, 0.11, 0.037, 0.012, 0.041, y 0.014 nM, utilizando TBS que contenía 0.1 % de BSA y 0.05 % de Tween 20. Se adicionaron 100 μL de cada una de las diluciones a cada pocillo y se dejó reposar la placa durante al menos una hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con TBS-T,

posteriormente se adicionaron a cada pocillo 100 μL de un anticuerpo monoclonal anti-hIDS diluido a 0.5 μg/mL con TBS que contenía 0.1 % de BSA y 0.05 % de Tween 20, y se dejó reposar la placa durante al menos una hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con TBS-T, se adicionaron a cada pocillo 100 μL de una solución de anticuerpo policlonal IgG anti-ratón marcado con HRP (Bethyl Laboratories, Inc.) diluido a 50 ng/mL con TBS que contenía 0.1 % de BSA y 0.05 % de Tween 20, y se dejó reposar la placa durante al menos una hora a temperatura ambiente. Cada pocillo se lavó tres veces con TBS-T, posteriormente se adicionaron a cada pocillo 50 μL de una solución de sustrato para el desarrollo de color, TMB Stabilized Substrate for Horseradish Peroxidase (Promega Corporation), y se dejó reposar la placa de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 100 μL de una solución de fin de reacción (ácido clorhídrico 1 N) a cada pocillo, y luego se midió la absorbancia a 450 nm de cada pocillo utilizando un lector de placas (MOLECULAR DEVICES, LLC). La $EC_{50}$ se calculó de los valores medidos obtenidos. Como resultado, los valores $EC_{50}$ de VHH5-GS3-hIDS, VHH6-GS3-hIDS y VHH5-Tandem-GS3-hIDS fueron 1.087, 22.67 y 0.077 nM, respectivamente. Estos resultados indican que estos tres tipos de péptidos de afinidad hTfR-hIDS tienen una afinidad relativamente alta por el hTfR.

[0171] [Ejemplo 17] Producción de ratón IDS-KO/hTfR-KI

Un ratón IDS-KO/hTfR-KI es un ratón que es hemideficiente en el gen de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) y es heterocigoto para el gen quimérico TfR. El ratón IDS-KO/hTfR-KI se produjo generalmente por el método siguiente. Se sintetizó químicamente un fragmento de ADN en el cual se dispuso un gen de resistencia a la neomicina flanqueado por secuencias loxP en el lado 3' de un ADNc que codificaba un TfR quimérico cuya región intracelular tenía la secuencia de aminoácidos del TfR de ratón y cuya región extracelular tenía la secuencia de aminoácidos del TfR de humano. Este fragmento de ADN se incorporó a un vector diana que tenía una secuencia de brazo 5' y una secuencia de brazo 3' por un método estándar, y éste se introdujo en células ES de ratón por un método de electroporación. Las células ES de ratón después de la transfección génica se sometieron a cultivo selectivo en presencia de neomicina, y se seleccionaron las células ES de ratón en las cuales el vector diana se había incorporado al cromosoma por recombinación homóloga. Las células ES de ratón recombinantes obtenidas se inyectaron en embriones de ratón ICR en estadio de 8 células (embriones huésped), y los embriones se trasplantaron a ratones pseudopreñados (ratones receptores) obtenidos por apareamiento con ratones con vasectomía. La descendencia obtenida (ratones quiméricos) se juzgó por el color de su pelo, y se seleccionaron los individuos en los cuales las células ES habían contribuido a la formación del organismo con alta eficiencia, es decir, los individuos que tenían una alta proporción de pelo blanco con respecto a la totalidad del pelo. Estos ratones quiméricos se cruzaron con un ratón ICR para obtener ratones F1. Se seleccionaron ratones F1 blancos, se analizó el ADN extraído del tejido de la cola y se designó a un ratón en el cual el gen hTfR de ratón había sido sustituido por un TfR quimérico en el cromosoma como ratón hTfR-KI. Con

base en este ratón, se produjo un ratón que era hemideficiente en el gen IDS y era heterocigoto para el gen quimérico TfR (ratón IDS-KO/hTfR-KI). La producción del ratón IDS-KO/hTfR-KI se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita en la literatura de patentes (WO 2016/208695).

[0172] [Ejemplo 17] Evaluación de la eficacia farmacológica de cada proteína en el ratón IDS-KO/hTfR-KI

La eficacia farmacológica del péptido de afinidad hTfR-hIDS se evaluó midiendo la concentración de heparán sulfato (HS), el cual se sabe que se acumula en los órganos de los pacientes con síndrome de Hunter, quienes genéticamente carecen de actividad hIDS. El método se describirá en detalle a continuación.

[0173] Los productos purificados de los tres tipos de proteínas, VHH5-GS3-hIDS, VHH6-GS3-hIDS, y VHH5-Tandem-GS3-hIDS, obtenidos en el ejemplo 15 se diluyeron con solución salina fisiológica para producir soluciones que contenían cada una de las proteínas a una concentración de 0.4 mg/mL.

[0174] Se administraron VHH5-GS3-hIDS, VHH6-GS3-hIDS y VHH5-Tandem-GS3-hIDS diluidos a ratones IDS-KO/hTfR KI de 50 semanas de edad a una dosis de 2 mg/kg mediante inyección en la vena de la cola durante un total de tres veces con una frecuencia de una vez a la semana. Además, se utilizaron ratones con el gen IDS de tipo silvestre como control de tipo silvestre, y se utilizaron ratones hemi-IDS-KO como controles patológicos. A estos ratones de control se les administró solución salina fisiológica un total de tres veces con una frecuencia de una vez por semana. El volumen de líquido administrado a cada grupo se ajustó para que fuera casi el mismo. Los genotipos de los ratones utilizados en este caso son los que se muestran en la Tabla 10. El número de ratones de cada grupo también se muestra en la Tabla 10.

[0175] [Tabla 9]

(Tabla 9) Genotipo del ratón utilizado para la evaluación de la eficacia farmacológica del péptido de afinidad hTfR-hIDS, y régimen de dosificación del péptido de afinidad hTfR-hIDS.

| Grupo | Genotipo (hTfR/ids) | Fármaco administrado | Dosis (mg/kg) | Volumen de líquido administrado (mL/kg) | Esquema de administración | Vía de administración | Número de individuos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control de tipo silvestre | Hetero/WT | Solución salina fisiológica | - | 5 | Una vez a la semana (un total de tres veces) | Inyección intravenosa | 3 |
| Control patológico | Hetero/Hemi | Solución salina fisiológica | - | | | | 3 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VHH6-GS3-hIDS-administrado | | VHH6-GS3-hIDS-administrado | 2 | | | | 5 |
| VHH5-GS3-hIDS-administrado | | VHH5-GS3-hIDS | 2 | | | | 5 |
| VHH5-tandem-GS3-hIDS-administrado | | VHH5-tandem-GS3-hIDS | 2 | | | | 2 |

[0176] Una semana después de la tercera administración, se recolectó CSF de la cisterna magna de cada uno de los ratones bajo un régimen de anestesia triple de Betorfal (Meiji Seika Pharma Co., Ltd.), Midazolam (Sandoz Group AG) y Domitor (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.). Después de la recolección de CSF, los ratones fueron sometidos a eutanasia por desangramiento. A continuación, se extrajeron los cerebros de los ratones y se congelaron rápidamente.

[0177] [Ejemplo 18] Cuantificación de heparán sulfato en tejido cerebral y CSF

La cuantificación de heparán sulfato (HS) en el cerebro se llevó a cabo en general por el método siguiente. Por cierto, el heparán sulfato es un sustrato para la hIDS.

[0178] Las soluciones (a) a (l) utilizadas en la prueba se prepararon por el procedimiento siguiente.

(a) MeCN/agua:

Se mezclaron 2 mL de agua para inyectables (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) y 18 mL de acetonitrilo (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation), y se utilizó como MeCN/agua.

(b) Disolvente marcado con deuterio:

En un baño de hielo, se añadió gota a gota 240 μL de cloruro de acetilo (Sigma-Aldrich Co., LLC) a 1.5 mL de metanol-$d_4$ (Sigma-Aldrich Co., LLC), y éste se utilizó como disolvente marcado con deuterio.

(c) Fase móvil A:

Una mezcla de 475 mL de agua para inyectables y 25 mL de solución acuosa 1M de formiato de amonio (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) se utilizó como fase móvil A.

(d) Fase móvil B:

Una mezcla de acetonitrilo y la fase móvil A en una proporción de 93:7 (v/v) se utilizó como fase móvil B.

(e) Solución stock estándar de heparán sulfato (solución stock estándar HS):

El sulfato de heparán (Iduron, Ltd.) se disolvió en agua para inyectables para preparar una solución de 5.0 mg/mL. Esta solución se utilizó como solución stock estándar de HS.

(f) Solución estándar interna de heparán sulfato (solución estándar interna HS):

Se midieron 40 μL de solución stock estándar de HS en un tubo de ensayo de borosilicato con tapón de rosca y se destiló el disolvente bajo una corriente de gas nitrógeno. Se adicionaron 400 μL del disolvente marcado con deuterio al producto seco sólido, se agitó la mezcla y se hizo reaccionar a 65°C durante 75 minutos para llevar a cabo una reacción de metanólisis de deuterio. Después de la reacción, el disolvente se destiló bajo una corriente de gas nitrógeno. Se adicionaron 500 μL de MeCN/agua al producto seco-sólido, y la mezcla se sometió a ultrasonicación durante 30 minutos. Esta solución se utilizó como solución estándar interna de heparán sulfato (solución estándar interna HS).

(i) Solución estándar interna:

Se adicionó 1 μL de la solución estándar interna de HS a 1 mL de metanol, y la mezcla se agitó y luego se sometió a ultrasonicación durante 30 minutos. Esta solución se utilizó como solución estándar interna.

(j) Muestras de la curva de calibración:

Se midieron 980 μL de agua para inyectables, y se adicionaron a ella los 10 μL de solución stock estándar de HS para preparar una solución que contenía 50 μg/mL de heparán sulfato. Esta solución se diluyó con agua para inyectables y se preparó una solución que contenía 5000 ng/mL de heparán sulfato. Esta solución se diluyó paso a paso con agua para inyectables, y se prepararon soluciones que contenían heparán sulfato a concentraciones de 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 y 5000 ng/mL. Se midieron 20 μL de cada una de estas soluciones y se dispensaron en un tubo de ensayo de borosilicato con tapón de rosca. Estas soluciones se utilizaron como muestras de la curva de calibración.

(k) Solución para la extracción de tejidos

Se adicionó 1 mL de polioxietileno (10) octilfenil éter a la solución salina fisiológica, y la cantidad total se ajustó a 500 mL. Esta solución se utilizó como solución para la extracción de tejidos.

(l) solución de carbonato de amonio al 10 %.

Se disolvieron 5 g de carbonato de amonio en 50 mL de agua para inyectables. Esta solución se utilizó como solución de carbonato de amonio al 10 %.

[0179] Se midieron 20 μL del CSF recolectado en el ejemplo 17 y se dispensaron en un tubo de ensayo de borosilicato con tapón de rosca. Esto se utilizó como solución de muestra de CSF.

[0180] El tejido cerebral extraído en el ejemplo 17 se liofilizó y se midió el peso en seco. El

tejido liofilizado se trituró en la solución para la extracción del tejido y, a continuación, se centrifugó el sobrenadante. Se midieron 20 μL de esta solución y se dispensaron en un tubo de ensayo de borosilicato con tapón de rosca. Ésta se utilizó como solución de muestra.

[0181] El disolvente de cada solución de muestra y la muestra de curva de calibración preparada se destiló bajo una corriente de gas nitrógeno. A cada producto seco sólido se adicionaron y agitaron 20 μL de 2,2-dimetoxipropano (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) y 200 μL de metanol clorhídrico (Sigma-Aldrich Co., LLC) con una concentración de ácido clorhídrico de 3 mol/L, y a continuación se llevó a cabo una reacción de metanólisis a una temperatura de reacción de 70°C durante un tiempo de reacción de 90 minutos. Después de la reacción, se finalizó enfriando en hielo y se adicionaron 200 μL de solución de carbonato de amonio al 10% y se añadieron a la misma 50 μL de la solución estándar interna. El disolvente se destiló bajo una corriente de gas nitrógeno y, a continuación, se adicionaron 250 μL de agua para inyectables al producto seco sólido. Esta se cargó en un cartucho de fase sólida (OASIS HLB (1 cc, 30 mg, Waters Corporation)) que se había acondicionado previamente haciendo pasar metanol y agua para inyectables a través de él y, después de lavar con agua para inyectables, se adicionaron 500 μL de metanol y la elución se realizó por centrifugación. El disolvente se destiló bajo una corriente de gas nitrógeno, posteriormente se adicionaron 2 mL de agua para inyectables y 18 mL de acetonitrilo, y el producto seco se redisolvió por ultrasonicación. Se centrifugó y a continuación se cargó el sobrenadante en un vial LC.

[0182] El análisis LC/MS/MS se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida de ultra alto rendimiento de interacción hidrofílica acoplada a un espectrofotómetro de masas cuadrupolar en tándem. Como espectrómetro de masas (aparato MS/MS) se utilizó el QTRAP5500 (AB Sciex, LLC), al que se agregó el Nexera X2 (Shimadzu Corporation) como aparato HPLC. Además, se utilizó como columna de LC una Acquity UPLC™ BEH Amide de 1.7 μm (2.1 × 150 mm, Waters Corporation). La fase móvil A y la fase móvil B se utilizaron como la fase móvil. La temperatura de la columna se estableció en 60°C.

[0183] La columna se equilibró con la fase móvil B, posteriormente se inyectaron 5 μL de una muestra y la cromatografía se llevó a cabo bajo las condiciones de gradiente de fase móvil indicadas en la Tabla 11. La tasa de flujo de la fase móvil se estableció en 0.4 mL/min.

[0184] [Tabla 10]

(Tabla 10) Condiciones para cromatografía líquida

| Tiempo transcurrido después de la inyección de la muestra (minutos) | Fase móvil A (% (v/v)) | Fase móvil B (% (v/v)) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 100 |
| 5.00 | 0 | 100 |
| 7.00 | 20 | 80 |

| | | |
|---|---|---|
| 12.5 | 20 | 80 |
| 13.0 | 70 | 30 |
| 15.0 | 70 | 30 |
| 15.5 | 0 | 100 |
| 20.0 | 0 | 100 |

[0185] Los parámetros fuente de iones del aparato MS/MS se establecieron como se indica en la Tabla 12, de acuerdo con el manual de instrucciones del QTRAP5500 (AB Sciex, LLC).

[0186] [Tabla 11]

(Tabla 11) Establecimiento de diversos parámetros para la fuente de iones del aparato MS/MS

| | |
|---|---|
| Fuente de iones | ESI (Turbo espray) |
| Polaridad | Positiva |
| Tipo de escáner | MRM |
| Voltaje de IonSpray | 5500 V |
| Temperatura del gas de calefacción | 425°C |
| Gas de cortina (CUR) | 30.00 |
| Gas de colisión (CAD) | 8.00 |
| Gas fuente de iones 1 (GS1) | 70.00 |
| Gas fuente de iones 2 (GS2) | 70.00 |
| Potencial de entrada | 10.00 |
| Duración | 15.00 min |

[0187] La Tabla 12 muestra los parámetros internos de MS

[0188] [Tabla 12]

(Tabla 12) Parámetros internos de MS

| | Ion precursor (m/z) Q1 | Ion producto (m/z) Q3 | Tiempo (msec) | DO (volts) | Energía de colisión (volts) | CXP (volts) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sustancia derivada de HS | 384.100 | 162.100 | 100.00 | 45.00 | 21.00 | 15.00 |
| Sustancia estándar interno de HS | 390.200 | 162.100 | 100.00 | 45.00 | 21.00 | 15.00 |
| Sustancia derivada de | 426.100 | 236.100 | 100.00 | 45.00 | 12.00 | 17.00 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DS | | | | | | |
| Sustancia estándar interno de DS | 432.200 | 239.200 | 100.00 | 45.00 | 12.00 | 17.00 |

[0189] Se realizó el análisis LC/MS/MS para cada muestra de la curva de calibración y se determinó el área del pico en el cromatograma correspondiente al ion producto derivado del heparán sulfato en la muestra de la curva de calibración (área del pico de detección de HS). Además, se determinó el área de un pico de detección correspondiente al ion producto derivado de la solución de estándar interno de HS (área del pico de detección de HS-IS).

[0190] El área del pico de detección derivado del heparán sulfato con respecto al área del pico de detección derivado de la solución de estándar interno de HS (área del pico de detección de HS / área del pico de detección de HS-IS) en cada muestra de la curva de calibración se graficó en el eje de ordenadas, la concentración de heparán sulfato en cada muestra de la curva de calibración se graficó en el eje de abscisas, y se obtuvo una ecuación de regresión utilizando el análisis discriminante cuadrático.

[0191] La solución de muestra de tejido cerebral se sometió al análisis LC/MS/MS, y el heparán sulfato contenido en la solución de muestra se cuantificó por interpolación en la ecuación de regresión.

[0192] La Figura 5 muestra los resultados de medición para el HS contenido en el CSF. En los grupos administrados con VHH5-GS3-hIDS, VHH6-GS3-hIDS y VHH5-Tandem-GS3-hIDS, la concentración de HS contenida en el CSF se redujo en comparación con el control patológico en todos los casos, y se entiende que todos ellos atravesaron la BBB, llegaron al sistema nervioso central y degradaron la HS que se había acumulado allí. Con respecto a VHH5-Tandem-GS3-hIDS, la concentración de HS contenida en el CSF fue menor a 40 % en comparación con el control patológico, y a partir de esto, se entiende que el enlace de dos péptidos de afinidad hTfR en tándem es un medio eficaz para permitir que la proteína de fusión atraviese la BBB.

[0193] La Figura 6 muestra los resultados de medición para el HS contenido en el tejido cerebral. En los grupos administrados con VHH5-GS3-hIDS, VHH6-GS3-hIDS, y VHH5-Tandem-GS3-hIDS, la concentración de HS contenida en el tejido cerebral se redujo en comparación con el control patológico en todos los casos, y se entiende que todos ellos atravesaron la BBB, llegaron al tejido cerebral, y degradaron la HS que se había acumulado allí. Con respecto a VHH5-Tandem-GS3-hIDS, la concentración de HS contenida en el tejido cerebral se redujo casi a la mitad en comparación con el control patológico, y a partir de esto, se entiende que el enlace de dos péptidos de afinidad hTfR en tándem es un medio eficaz para permitir que la proteína de fusión atraviese la BBB. Además, a partir de estos resultados se puede predecir que cuando la hIDS fusionada a un péptido de afinidad hTfR se inyecta por vía intravenosa a un paciente con síndrome de Hunter, la

proteína de fusión puede atravesar la BBB, llegar al sistema nervioso central del paciente y ejercer la eficacia farmacológica degradando el HS que se ha acumulado allí.

[0194] [Ejemplo 18] Producción del vector de expresión del péptido de afinidad hTfR-hSGSH

El vector de expresión de mamíferos pCI-neo (Promega Corporation) se digirió con MluI y NotI. Un fragmento de ADN que tiene un sitio MluI en el lado 5' y un sitio NotI en el lado 3' de un gen que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:68 que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:67, en la cual la heparán N-sulfatasa (hSGSH) que tiene una etiqueta DYKDDDDK adicionada en el N-terminal establecida en SEQ ID NO: 66 está unida al C-terminal del péptido de afinidad hTfR 3 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:5 por medio de un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:59, se sintetizó artificialmente. Éste se digirió con MluI y NotI y se incorporó entre un sitio MluI y un sitio NotI del vector de expresión de mamíferos pCI-neo, y se produjo un vector de expresión para VHH3-GS3-hSGSH. Este vector de expresión se nombró pCI-neo-VHH3-GS3-hSGSH.

[0195] [Ejemplo 19] Producción del péptido de afinidad hTfR-hSGSH

El pCI-neo-VHH3-GS3-hSGSH producido en el ejemplo 18 se introdujo en células CHO-S utilizando el sistema de expresión ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto, y se expresó en las células CHO-S una proteína (VHH3-GS3-hSGSH) en la cual estaban unidos el péptido de afinidad hTfR 3 y la hSGSH. Estas células expresan VHH3-GS3-hSGSH y secretan esta, en el fluido de cultivo. Aquí, las células CHO-S en las cuales se había introducido pCI-neo-VHH3-GS3-hSGSH se designaron como células que expresan pCI-neo-VHH3-GS3-hSGSH. Por cierto, una proteína de fusión de un péptido de afinidad hTfR y hSGSH se denominará como péptido de afinidad hTfR-hSGSH.

[0196] Las células que expresan pCI-neo-VHH3-GS3-hSGSH se cultivaron de acuerdo con el protocolo adjunto al Sistema de Expresión ExpiCHO. Específicamente, las células se suspendieron en 15 mL de un medio de cultivo para tener una concentración de $6\times10^6$ células/mL, esta suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer que tiene un volumen de 150 mL, y las células se cultivaron durante un día a 37°C en un ambiente humidificado compuesto de 5 % de $CO_2$ y 95 % de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm. El líquido de alimentación y el líquido potenciador incluidos en el Sistema de Expresión ExpiCHO se adicionaron al cultivo, y las células se cultivaron durante 9 días a 32°C en un ambiente humidificado compuesto de 5 % de $CO_2$ y 95 % de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm. Después del cultivo, el sobrenadante obtenido centrifugando el fluido de cultivo (3000 g, durante 5 minutos) se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore Corporation), y se recolectó como sobrenadante del cultivo.

[0197] Se equilibró una columna abierta empaquetada con 1 mL de gel de afinidad con

anticuerpo anti-FLAG M1 unido a agarosa (MERCK & Co., Inc.) haciendo pasar 5 volúmenes de columna de solución amortiguadora Tris 50 mM (pH 7.5) que contenía 150 mM NaCl y 1 mM $CaCl_2$ a través de la columna. Además, el sobrenadante del cultivo se preparó para que fuera 1 mM de $CaCl_2$ adicionando 1 M de $CaCl_2$ en una proporción de 1/1000. A continuación, se cargó el sobrenadante del cultivo en la columna para permitir que VHH3-GS3-hSGSH se uniera a la resina. La columna se lavó haciendo pasar 5 volúmenes de solución amortiguadora Tris 50 mM (pH 7.5) que contenía 150 mM NaCl y 1 mM $CaCl_2$ a través de la columna, y después se eluyó VHH3-GS3-hSGSH haciendo pasar solución amortiguadora Tris 50 mM (pH 7.5) que contenía 150 mM de NaCl y 2 mM de EDTA a través de la columna. Ésta se sometió a intercambio de amortiguador utilizando una columna PD-10 (Cytiva, Inc.), para que el disolvente se reemplazara por una solución amortiguadora de fosfato 20 mM que contenía 7.5 mg/mL de sacarosa y 0.8 mg/mL de NaCl. La solución obtenida se utilizó en los siguientes experimentos como producto purificado de VHH3-GS3-hSGSH.

[0198] [Ejemplo 20] Evaluación de la actividad de unión del péptido de afinidad hTfR-hSGSH al TfR de humano y TfR de mono.

La afinidad del VHH-GS3-hSGSH producido en el ejemplo 19 por el hTfR y el TfR de mono se examinó de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 7. La Tabla 13 muestra los resultados de medición para las constantes de tasa de asociación (kon), las constantes de tasa de disociación (koff) , y la constante de disociación ($K_D$) de VHH3-GS3-hSGSH para hTfR y TfR de mono (TfR de mono cynomolgus). Con respecto al TfR de mono cynomolgus, un TfR de mono recombinante (r-monkey TfR, Sino Biological, Inc.) que tiene la secuencia de aminoácidos de la región extracelular de la TfR de mono cynomolgus, desde el residuo 89 de cisteína desde el N-terminal hasta la fenilalanina en el C-terminal en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:2, con una etiqueta de histidina adicionada en el N-terminal, se utilizó como el TfR de mono.

[0199] [Tabla 13]

(Tabla 13) Actividad de unión del péptido de afinidad hTfR-hSGSH hacia TfR de humano y TfR de mono.

| | Especies animales | kon (1/Ms) | koff (1/s) | $k_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|
| VHH3-GS3-hSGSH | Mono Cynomolgus | $4.17 \times 10^{5}$ | $4.81 \times 10^{-7}$ | $1.16 \times 10^{-12}$ |
| | Humano | $4.23 \times 10^{5}$ | $< 1.0 \times 10^{-7}$ | $< 1.0 \times 10^{-12}$ |

[0200] [Ejemplo 21] Evaluación de la eficacia farmacológica del péptido de afinidad hTfR-hSGSH

La eficacia farmacológica del péptido de afinidad hTfR-hSGSH se evaluó midiendo la concentración de heparán sulfato (HS), el cual se sabe que se acumula en los órganos de pacientes con síndrome de Sanfilippo A quienes genéticamente carecen de la actividad hSGSH. El método se describirá en detalle a continuación.

[0201] Un ratón hTfR-KI producido por el método descrito en el ejemplo 17 se cruzó con un ratón knockout del gen SGSH (ratón SGSH-KO), el cual es un ratón modelo para el síndrome de Sanfilippo A, para obtener un ratón SGSH-KO/hTfR KI.

[0202] El VHH3-GS3-hSGSH obtenido en el ejemplo 21 se diluyó con solución salina fisiológica, y se produjeron soluciones que contenían cada una de las proteínas a una concentración de 0.4 mg/mL.

[0203] Se administró VHH3-GS3-hSGSH diluido a ratones SGSH-KO/hTfR KI de 16 a 19 semanas de edad a una dosis de 2 mg/kg mediante inyección en la vena de la cola durante un total de cuatro veces con una frecuencia de una vez a la semana. Además, se utilizaron ratones con el gen SGSH de tipo silvestre como controles de tipo silvestre, y se utilizaron ratones SGSH-KO homocigotos como controles patológicos. A estos ratones de control se les administró solución salina fisiológica un total de tres veces con una frecuencia de una vez por semana. El volumen de líquido administrado a cada grupo se ajustó para que fuera casi el mismo. Los genotipos de los ratones SGSH-KO/hTfR KI utilizados en este caso son los que se muestran en la Tabla 12. El número de ratones de cada grupo también se muestra en la Tabla 14.

[0204] [Tabla 14]

(Tabla 14) Genotipo de ratón utilizado para la evaluación de la eficacia farmacológica del péptido de afinidad hTfR-hSGSH, y régimen de dosificación del péptido de afinidad hTfR-hSGSH.

| Grupo | Genotipo (hTfR/sgsh) | Fármaco administrado | Dosis (mg/kg) | Volumen de líquido administrado (mL/kg) | Esquema de administración | Vía de administración | Número de individuos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control de tipo silvestre | WT/WT | Solución salina fisiológica | - | 5 | Una vez a la semana (un total de cuatro veces) | Inyección intravenosa | 3 |
| Control patológico | Hemi/KO | Solución salina fisiológica | - | | | | 3 |
| VHH3-GS3-hSGSH-administrado | | VHH3-GS3-hSGSH | 2 | | | | 3 |

[0205] Una semana después de la cuarta administración, se recolectó CSF de la cisterna magna de cada uno de los ratones bajo un régimen de anestesia triple de Betorfal (Meiji Seika Pharma Co., Ltd.), Midazolam (Sandoz Group AG) y Domitor (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.).

Después de la recolección de CSF, los ratones fueron sometidos a eutanasia por desangramiento. A continuación, se extrajeron los cerebros de los ratones y se congelaron rápidamente. Las cantidades de HS contenidas en el CSF y en el tejido cerebral se midieron por el método descrito en el ejemplo 18.

[0206] La Figura 7 muestra los resultados de medición del HS contenido en el tejido cerebral y en el CSF. En el grupo con VHH3-GS3-hSGSH-administrado, la concentración de HS en el tejido cerebral se redujo en aproximadamente un 37% en comparación con el control patológico, y se entiende que VHH3-GS3-hSGSH atravesó la BBB, llegó al sistema nervioso central y degradó el HS que se había acumulado allí (Figura 7 panel (a)). Además, en el grupo con VHH3-GS3-hSGSH-administrado, la concentración de HS contenido en el CSF se redujo en aproximadamente 13 % en comparación con el control patológico, y se entiende que VHH3-GS3-hSGSH atravesó la BBB, llegó al sistema nervioso central y degradó el HS que se había acumulado allí (Figura 7 panel (b)). A partir de estos resultados, se puede predecir que cuando la hSGSH fusionada a un péptido de afinidad hTfR se inyecta por vía intravenosa a un paciente con síndrome de Sanfilippo A, la proteína de fusión puede atravesar la BBB, llegar al sistema nervioso central del paciente y ejercer la eficacia farmacológica degradando el HS que se ha acumulado allí.

**Aplicación industrial**

[0207] De acuerdo con una modalidad de la presente invención, se puede proporcionar un fármaco en el cual se unen un péptido de afinidad con el receptor de transferrina humano y una sustancia farmacológicamente activa, y el cual puede atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer su eficacia en el sistema nervioso central.

**Lista de signos de referencia**

[0208] 1: vaso sanguíneo, 2: parénquima cerebral.

**Listado de secuencias texto libre**

[0209] SEQ ID NO:1: Secuencia de aminoácidos del receptor de transferrina humano
SEQ ID NO:2: Secuencia de aminoácidos del receptor de transferrina del mono cynomolgus
SEQ ID NO:3: Secuencia de aminoácidos del péptido de afinidad hTfR 1
SEQ ID NO:4: Secuencia de aminoácidos del péptido de afinidad hTfR 2
SEQ ID NO:5: Secuencia de aminoácidos del péptido de afinidad hTfR 3
SEQ ID NO:6: Secuencia de aminoácidos del péptido de afinidad hTfR 4
SEQ ID NO:7: Secuencia de aminoácidos del péptido de afinidad hTfR 5
SEQ ID NO:8: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR1 del péptido de afinidad hTfR 1
SEQ ID NO:9: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR1 del péptido de afinidad hTfR 1
SEQ ID NO:10: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 1
SEQ ID NO:11: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 1
SEQ ID NO:12: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR3 del péptido de afinidad hTfR 1
SEQ ID NO:13: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR3 del péptido de afinidad hTfR 1

SEQ ID NO:14: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR1 del péptido de afinidad hTfR 2

SEQ ID NO:15: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR1 del péptido de afinidad hTfR 2

SEQ ID NO:16: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 2

SEQ ID NO:17: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 2

SEQ ID NO:18: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR3 del péptido de afinidad hTfR 2

SEQ ID NO:19: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR3 del péptido de afinidad hTfR 2

SEQ ID NO:20: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR1 del péptido de afinidad hTfR 3

SEQ ID NO:21: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR1 del péptido de afinidad hTfR 3

SEQ ID NO:22: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 3

SEQ ID NO:23: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 3

SEQ ID NO:24: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR3 del péptido de afinidad hTfR 3

SEQ ID NO:25: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR3 del péptido de afinidad hTfR 3

SEQ ID NO:26: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR1 del péptido de afinidad hTfR 4

SEQ ID NO:27: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR1 del péptido de afinidad hTfR 4

SEQ ID NO:28: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 4

SEQ ID NO:29: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 4

SEQ ID NO:30: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR3 del péptido de afinidad hTfR 4

SEQ ID NO:31: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR3 del péptido de afinidad hTfR 4

SEQ ID NO:32: Secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico 1

SEQ ID NO:33: Secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico 2

SEQ ID NO:34: Secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico 3

SEQ ID NO:35: Secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico 4

SEQ ID NO:36: Secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico 5

SEQ ID NO:37: Un ejemplo de secuencia de aminoácidos de la región Fc de la IgG humana

SEQ ID NO:38: Secuencia de aminoácidos de la albúmina sérica humana

SEQ ID NO:39: Dominio de unión a albúmina de la proteína derivada de la cepa G418 de *Streptococcus*

SEQ ID NO:40: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO:41: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de trastuzumab

SEQ ID NO:42: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR 1 y la cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO:43: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR 2 y la cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO:44: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR 3 y la cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO:45: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR 4 y la cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO:46: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR 5 y la cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO:47: Secuencia de nucleótidos del ADN que codifica la proteína de fusión del péptido de afinidad hTfR 1 y la cadena pesada de trastuzumab, secuencia sintetizada

SEQ ID NO:48: Secuencia de nucleótidos del ADN que codifica la cadena ligera de trastuzumab, secuencia sintetizada

SEQ ID NO:49: Secuencia de nucleótidos del cebador hTfR5', secuencia sintetizada

SEQ ID NO:50: Secuencia de nucleótidos del cebador hTfR3', secuencia sintetizada

SEQ ID NO:51: Secuencia de nucleótidos de ADN en la cual el gen de resistencia a la neomicina flanqueado por secuencias loxP está dispuesto en el lado 3' del ADNc que codifica el hTfR quimérico, secuencia sintetizada.

SEQ ID NO:52: Secuencia de nucleótidos del brazo 5' del vector diana, secuencia sintetizada

SEQ ID NO:53: Secuencia de nucleótidos del brazo 3' del vector diana, secuencia sintetizada

SEQ ID NO:54: Etiqueta peptídica

SEQ ID NO:55: Secuencia de aminoácidos del péptido de afinidad hTfR 6

SEQ ID NO:56: Secuencia de aminoácidos 1 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 6

SEQ ID NO:57: Secuencia de aminoácidos 2 de la CDR2 del péptido de afinidad hTfR 6

SEQ ID NO:58: Secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico 6

SEQ ID NO:59: Secuencia de aminoácidos del I2S humano

SEQ ID NO:60: Secuencia de aminoácidos de VHH6-GS3-hI2S

SEQ ID NO:61: Secuencia de nucleótidos de VHH6-GS3-hI2S

SEQ ID NO:62: Secuencia de aminoácidos de VHH5-GS3-hI2S

SEQ ID NO:63: Secuencia de nucleótidos de VHH5-GS3-hI2S

SEQ ID NO:64: Secuencia de aminoácidos de VHH5-Tandem-GS3-hI2S

SEQ ID NO:65: Secuencia de nucleótidos de VHH5-Tandem-GS3-hI2S

SEQ ID NO:66: Secuencia de aminoácidos de SGSH humana

SEQ ID NO:67: Secuencia de aminoácidos de VHH3-GS3-hSGSH

SEQ ID NO:68: Secuencia de nucleótidos de VHH3-GS3-hSGSH

SEQ ID NO:69: Secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico 7