

DESCRIPCIÓN

Título de la Invención

PÉPTIDO DE AFINIDAD CON RECEPTOR DE TRANSFERRINA HUMANA

5 Campo De La Invención

[0001] La presente invención, en una modalidad, se refiere a un péptido que tiene una afinidad para el receptor de transferrina humana, el cual se utiliza para unirse a un compuesto (una proteína, ácido nucleico, compuesto con bajo peso molecular, entre otros) que necesita mostrar su
10 función en un sistema nervioso central (SNC) y al cual se le permite pasar a través de una barrera hematoencefálica, y un uso del mismo.

Antecedentes De La Invención

[0002] Los capilares que suministran sangre a la mayoría de los tejidos del cerebro, salvo para varias regiones que incluyen los órganos que rodean los ventrículos (glándula pineal, glándula pituitaria y cuerno
15 posterior), son diferentes de los capilares presentes en otros tejidos, como, por ejemplo, los músculos ya que las células endoteliales que forman el endotelio se adhieren estrechamente entre sí por medio de una adhesión intracelular fuerte. Por lo tanto, se obstaculizar el transporte pasivo de una sustancia de la sangre al cerebro, y a excepción de una sustancia
20 soluble en grasa o una sustancia que tiene un peso molecular pequeño (200 a 500 Dalton o menos) y que son eléctricamente neutros en la vecindad de un pH fisiológico, es difícil que la sustancia migre de un capilar a un parénquima cerebral. Dicho mecanismo que restringe el intercambio de sustancias entre la sangre y el fluido de tejido cerebral a
25 través del endotelio capilar cerebral es llamado una barrera

hematoencefálica (BHE). Además, la barrera hematoencefálica también restringe el intercambio de sustancias entre el fluido de tejido y la sangre en el sistema nervioso central, incluyendo, el cerebro y la médula espinal, además del cerebro.

5 [0003] Debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, la mayoría de las células del sistema nervioso central mantienen su homeostasis bioquímica sin ser afectadas por la fluctuación de concentración de sustancias, como, por ejemplo, hormonas y citocinas en la sangre. Sin embargo, la presencia de la barrera hematoencefálica
10 profundiza un problema en el desarrollo de un fármaco. Por ejemplo, para mucopolisacaridosis tipo II (síndrome de Hunter), el cual es un trastorno metabólico hereditario ocasionado por la deficiencia de iduronato-2-sulfatasa, se ha llevado a cabo una terapia de reemplazo de enzima mediante la administración intravenosa de iduronato-2-sulfatasa
15 recombinante. Sin embargo, para las anormalidades importantes del sistema nervioso central (SNC) observadas en el síndrome de Hunter, la iduronato-2-sulfatasa tiene baja efectividad debido a que ésta no puede pasar a través de la barrera hematoencefálica. Además, para una enfermedad del sistema nervioso central, como, por ejemplo, una
20 enfermedad de Alzheimer y tumor cerebral, es necesario permitir que el fármaco llegue al sistema nervioso central, pero un fármaco que no puede pasar a través de la barrera hematoencefálica no puede mostrar una efectividad farmacológica.

[0004] Se han desarrollado diversos métodos que permiten que dicha
25 sustancia polimérica se active en el sistema nervioso central, como, por ejemplo, al permitir el paso de una proteína a través de la barrera

hematoencefálica. Se han informado sobre varios métodos que modifica una sustancia polimérica que tiene una afinidad para una proteína de membrana presente en una célula endotelial de un capilar cerebral. Los ejemplos de la proteína de membrana presente en la célula endotelial del capilar cerebral incluyen receptores de compuestos, como, por ejemplo, insulina, transferrina, factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I, IGF-II), LDL y leptina. Entre los anteriores, con respecto al anticuerpo en contra del receptor de transferrina, se ha informado sobre un anticuerpo que puede pasar a través de la barrera hematoencefálica para migrar al parénquima cerebral y el cual se une a un fármaco para se activará en el sistema nervioso central y que puede permitir a dicho fármaco migrar al cerebro (Literatura de Patente 1 a 8). [0005] Además, en 2021, se ha comercializado un agente para tratar el síndrome de Hunter (IZCARGO (marca registrada)) que puede ejercer una efectividad farmacológica en el sistema nervioso central al pasar a través de la barrera hematoencefálica, en el cual la iduronato-2-sulfatasa se une a un anticuerpo de receptor de anti-transferrina (Literatura No Patentada 1).

Lista de Citas

Literatura de Patentes

[0006]

[Literatura de Patente 1] Solicitud de Patente Estadounidense, Publicación No. 2007/0082380

[Literatura de Patente 2] Solicitud de Patente Estadounidense, Publicación No. 2008/0152645

[Literatura de Patente 3] Solicitud de Patente Estadounidense,

Publicación No. 2009/0053219

[Literatura de Patente 4] Solicitud de Patente Estadounidense,
Publicación No. 2011/0110935

5 [Literatura de Patente 5] Solicitud de Patente Estadounidense,
Publicación No. 2018/0171012

[Literatura de Patente 6] Solicitud de Patente Estadounidense,
Publicación No. 2018/0179291

[Literatura de Patente 7] Solicitud de Patente Estadounidense,
Publicación No. 2020/0317798

10 [Literatura de Patente 8] Solicitud de Patente Estadounidense,
Publicación No. 2020/0384061

Literatura No Patentada

[0007]

15 [Literatura No Patentada 1] Inserto de Paquete de IZCARGO
(nombre marcario) para infusión I. V. de 10 mg, Primera Edición,
creado en marzo de 2021.

Breve Descripción De La Invención

Problema Técnico

20 [0008] Un objeto de la presente invención, ante la presencia de ciertos
antecedentes, es proporcionar un péptido que tiene una afinidad para el
receptor de transferrina humana, el cual puede utilizarse para unirse a un
compuesto (una proteína, ácido nucleico, compuesto con bajo peso
molecular, entre otros) que necesita mostrar su función en un sistema
nervioso central (SNC) y al cual se le permite pasar a través de una barrera
25 hematoencefálica, y un uso del mismo.

Solución del Problema

[0009] En los estudios dirigidos al objeto anterior, los inventores de la presente, como resultado de un estudio diligente, han descubierto que un péptido (péptido de región variable de anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR) obtenido a través de un método de producción descrito en detalle en esta memoria descriptiva, el péptido que tiene una afinidad para un receptor de transferrina humana (hTfR) y que incluye una región variable de un anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR que reconoce de manera específica una región extracelular de hTfR, pasa de manera eficiente a través de la barrera hematoencefálica, y han completado la presente invención. Esto es, la presente invención incluye lo siguiente: En la invención que se muestra a continuación (1 a 104), el término “péptido de afinidad con receptor de transferrina humana” puede reemplazarse con un péptido que incluye una región variable de un anticuerpo de cadena pesada, y el término “péptido” puede reemplazarse con una proteína.

1. Un péptido que tiene una afinidad por un receptor de transferrina humana (un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana) que comprende una región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3.

en donde el péptido se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) y (2),

(1) un péptido, en el cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y la

secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12, y

(2) un péptido, en el cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

2. Un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana, el cual es un péptido seleccionado a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) a (3),

(1) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia de aminoácido a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 4, y que tiene tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3, las cuales tienen las secuencias de aminoácido que se muestra en (1) del 1 antes descrito,

(2) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia de aminoácido a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5, y que tiene tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3, las cuales tienen las secuencias de aminoácido que se muestra en (1) del 1 antes descrito, y

(3) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia de aminoácido a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 6, y que tiene tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3, las cuales tienen las secuencias de aminoácido que se muestra en (2) del 1 antes descrito.

3. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 2 antes descrito, en donde la identidad de la secuencia de aminoácido es 85% o más.

4. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 2 antes descrito, en donde la identidad de la secuencia de aminoácido es 90% o más.

5. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 2 antes descrito, en donde la identidad de la secuencia de aminoácido es 95% o más.

6. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 1 antes descrito, en donde el péptido incluye la secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste en (1) a (3),

(1) una secuencia de aminoácido en la cual los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 4 se sustituyen, eliminan o añaden, y en la cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12,

(2) una secuencia de aminoácido en la cual los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5 se sustituyen, eliminan o añaden, y en la cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y la

secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12, y

(3) una secuencia de aminoácido en la cual los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 6 se sustituyen, eliminan o añaden, y en la cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

7. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 6 antes descrito, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 5.

8. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 6 antes descrito, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 3.

9. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 8 antes descritos, en donde el péptido tiene una afinidad por una región extracelular de un receptor de transferrina humana y una región extracelular de un receptor de transferrina de mono.

10. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 9 antes descrito, en donde una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana y una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina de mono son 5×10^{-11} M a 5×10^{-7} M.

11. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana

de acuerdo con el 9 antes descrito, en donde ambas constantes de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana son todos 5×10^{-11} M a 5×10^{-8} M.

12. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 9 antes descrito, en donde en un caso en donde un valor de una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana se designa como 1, un valor de una constante de disociación con el receptor de transferrina de mono es 1 a 10.

13. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 9 antes descrito, en donde en un caso en donde un valor de una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana se designa como 1, un valor de una constante de disociación con el receptor de transferrina de mono es 3 a 10.

14. Un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana en el cual una pluralidad del péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 13 antes descritos, se unen, en donde el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) a (3),

(1) un péptido en el cual 2 a 10 de los péptidos de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 12 antes descritos se unen de manera directa o a través de un ligador,

(2) un péptido en el cual 2 o 3 de los péptidos de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 12 antes descritos se unen de manera directa o a través de un ligador, y

(3) un péptido en el cual 2 de los péptidos de afinidad con

receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 12 antes descritos se unen de manera directa o a través de un ligador,

15. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 14 antes descrito, en donde cada uno de los ligadores enlazan una pluralidad de los péptidos de afinidad con receptor de transferrina humana entre sí es un ligador peptídico que consiste en 1 a 6 aminoácidos.

16. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 14 antes descrito, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, y SEQ ID NO: 25.

17. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 14 antes descrito, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico consiste en la secuencia de aminoácido en la cual 2 a 10 secuencias de aminoácido cada una se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21 se configuran en serie.

18. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 1 antes descrito, en donde el péptido incluye la

secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6.

5 19. Un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana, el cual incluye la secuencia de aminoácido en la cual 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácido seleccionados a partir del grupo que consiste en las secuencias establecidas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6 se sustituyen, eliminan o añaden.

10 20. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 37 antes descrito, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 5.

 21. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 37 antes descrito, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 3.

15 22. un complejo de fármaco-péptido de afinidad con receptor de transferrina humana, en el cual un fármaco se une al péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 21 antes descritos.

20 23. El complejo de acuerdo con el 22 antes descrito, en donde el fármaco es cualquiera de los siguientes: una proteína (A) diferente, un ácido nucleico, o un compuesto de bajo peso molecular.

 24. Una proteína de fusión del péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 21 antes descritos, y una proteína (A) diferente.

25 25. La proteína de fusión de acuerdo con el 24 antes descrito, en la cual el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana se une

de manera directa o a través del ligador a la terminal C de la proteína (A) diferente.

26. La proteína de fusión de acuerdo con el 24 antes descrito, en la cual el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana se une de manera directa o a través del ligador a la terminal N de la proteína (A) diferente.

27. La proteína de fusión de acuerdo con el 25 o 26 antes descritos, en donde el ligador que enlaza el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana con la proteína (A) diferente es un ligador peptídico que consiste en 1 a 60 aminoácidos.

28. La proteína de fusión de acuerdo con el 27 antes descrito, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico que enlaza el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana a la proteína (A) diferente se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, y SEQ ID NO: 25.

29. La proteína de fusión de acuerdo con el 27 antes descrito, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico que enlaza el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana a la proteína (A) diferente consiste en la secuencia de aminoácido en la cual 2 a 10 secuencias de aminoácido se selecciona cada uno a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-

Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21 se configuran en serie.

30. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 24 a 29 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente es una proteína derivada a partir de un humano.

31. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 24 a 30 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente es una citocina, un factor de crecimiento o un fármaco de anticuerpo.

32. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 24 a 30 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente se selecciona a partir del grupo que consiste en un factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro un factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una enzima lisosomal, un factor neurotrófico ciliar (CNTF), un factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), una neurotrofina 3, una neurotrofina 4/5, una neurotrofina 6, una neuregulina 1, una eritropoyetina, una darbepoetina, una activina, un factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), un factor de crecimiento fibroblástico 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 y 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 de PD-1, una PD-L1, una PD-L2, una enzima con actividad de degradación de β -amiloide, un

anticuerpo anti- β -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.

5 33. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 24 a 30
antes descritos, en donde la proteína (A) diferente es una enzima
lisosomal, y la enzima lisosomal se selecciona a partir del grupo que
consiste en α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, α -glucosidasa ácida,
glucocerebrosidasa, β -galactosidasa, proteína activadora de GM2, β -
10 hexosaminidasa A, β -hexosaminidasa B, N-acetilglucosamina-1-
fosfotransferasa, α -manosidasa, β -manosidasa, galactosilceramidasa,
saposina C, arilsulfatasa A, α -L-fucosidasa, aspartilglucosaminidasa, α -
N-acetilgalactosaminidasa, esfingomielinasa ácida, α -galactosidasa A, β -
glucuronidasa, heparán N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, acetil-
15 CoA α -glucosaminida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-
sulfatasa, ceramidasa ácida, amilo-1,6-glucosidasa, sialidasa, tioesterasa
de proteína palmitoilada-1, tripeptidil peptidasa-1, hialuronidasa-1,
CLN1 y CLN2.

20 34. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 24 a 33
antes descritos, en donde la seroalbúmina se une con la proteína de fusión.

35. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 24 a 33
antes descritos, en donde una región de Fc de IgG humana se une con la
proteína de fusión.

25 36. Un ácido nucleico que codifica el péptido de afinidad con
receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 1 a 21 de
los antes descritos.

37. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 24 a 35 de los antes descritos.

38. Un vector de expresión que comprendel ácido nucleico de acuerdo con 36 o 37 antes descritos.

5 39. Una célula transformada con el vector de expresión de acuerdo con el 38 antes descrito.

40. La célula de acuerdo con el 39 antes descrito, en donde la célula se deriva a partir de un mamífero.

10 41. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 1 antes descrito, el cual se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) a (3),

15 (1) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 4, en el cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12,

20 (2) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5, en el cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID

25

NO: 12, y

(3) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 6, en el cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

42. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 41 antes descrito, en donde la identidad de la secuencia de aminoácido es 85% o más.

43. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 41 antes descrito, en donde la identidad de la secuencia de aminoácido es 90% o más.

44. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 41 antes descrito, en donde la identidad de la secuencia de aminoácido es 95% o más.

45. Un complejo de fármaco-péptido de afinidad con receptor de transferrina humana, en el cual un fármaco se une al péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de 37 a 44 antes descritos.

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

47. Una proteína de fusión de un péptido de afinidad con

receptor de transferrina humana, el cual tiene una afinidad por una molécula presente en una superficie de una célula endotelial vascular como un antígeno, y una proteína (A) diferente, en donde el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana se une con la terminal C de la proteína (A) diferente directamente o a través de un ligador, o en donde el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana se une con la terminal N de la proteína (A) diferente directamente o a través del ligador.

48. La proteína de fusión de acuerdo con el 47 antes descrito, en donde el ligador es un ligador peptídico que consiste en 1 a 60 aminoácidos.

49. La proteína de fusión de acuerdo con el 48 antes descrito, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, y SEQ ID NO: 25.

50. La proteína de fusión de acuerdo con el 48 antes descrito, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico consiste en la secuencia de aminoácido en la cual 2 a 10 secuencias de aminoácido cada una se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21 se configuran en serie.

51. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 46 a 50 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente es una proteína derivada a partir de un humano.

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

53. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 24 a 51 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente se selecciona a partir del grupo que consiste en un factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro un factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una enzima lisosomal, un factor neurotrófico ciliar (CNTF), un factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), una neurotrofina 3, una neurotrofina 4/5, una neurotrofina 6, una neuregulina 1, una eritropoyetina, una darbepoetina, una activina, un factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), un factor de crecimiento fibroblástico 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 y 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 de PD-1, una PD-L1, una PD-L2, una enzima con actividad de degradación de β -amiloide, un anticuerpo anti- β -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 la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 46 a 51 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente es una enzima lisosomal, y la enzima lisosomal se selecciona a partir del grupo que consiste en α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, α -glucosidasa ácida, glucocerebrosidasa, β -galactosidasa, proteína activadora de GM2, β -hexosaminidasa A, β -hexosaminidasa B, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, α -manosidasa, β -manosidasa, galactosilceramidasa, saposina C, arilsulfatasa A, α -L-fucosidasa, aspartilglucosaminidasa, α -N-acetilgalactosaminidasa, esfingomielinasa ácida, α -galactosidasa A, β -glucuronidasa, heparán N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA α -glucosaminida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, ceramidasa ácida, amilo-1,6-glucosidasa, sialidasa, tioesterasa de proteína palmitoilada-1, tripeptidil peptidasa-1, hialuronidasa-1, CLN1 y CLN2.

55. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 46 a 54 antes descritos, en donde la seroalbúmina se une de manera adicional a la proteína de fusión.

56. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 46 a 54 antes descritos, en donde una región de Fc de IgG humana se une de manera adicional a la proteína de fusión.

57. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 45 a 56 antes descritos, en donde la célula endotelial vascular es una célula endotelial vascular cerebral.

58. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con

cualquiera de 45 a 57 antes descritos, en donde la molécula presente en una superficie de la célula endotelial vascular se selecciona a partir del grupo que consiste en un receptor de transferrina (TfR), un receptor de insulina, un receptor de leptina, un receptor de lipoproteína, un receptor de IGF, OATP-F, un transportador de anión orgánico, MCT-8 y un transportador de monocarboxilato, y es particularmente una molécula derivada de un humano.

59. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 45 a 57 antes descritos, en donde la molécula presente en una superficie de la célula endotelial vascular es un receptor de transferrina (TfR), en particular un receptor de transferrina derivado a partir de un humano.

60. El complejo de acuerdo con 45 o 46 antes descritos, en donde el fármaco se une al péptido de afinidad con receptor de transferrina humana a través de un ligador seleccionado a partir del grupo que consiste en un polietilenglicol, un polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, un poliol polioxietilado, un alcohol polivinílico, un polisacárido, una dextrana, un éter de polivinilo, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, una quitina, un ácido hialurónico, biotina-estreptavidina, y un derivado de los mismos.

61. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con 45 a 60 antes descritos, en donde el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana es la totalidad o una parte de un anticuerpo de cadena pesada derivado a partir de un animal camelidae o un receptor de nuevo

antígeno de inmunoglobulina derivado a partir de peces cartilaginosos.

62. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con 61 antes descrito, en donde el anticuerpo de cadena pesada es un anticuerpo de cadena pesada única.

5 63. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con 61 o 62 antes descritos, en donde el anticuerpo de cadena pesada se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) a (4),

(1) un anticuerpo de cadena pesada que consiste en la totalidad o una parte de una región variable de una cadena pesada,

10 (2) un anticuerpo de cadena pesada que consiste en 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 que consiste en la totalidad de la región variable y la región bisagra de la cadena pesada, y

15 (4) un anticuerpo de cadena pesada que consiste en una parte de una región constante de la cadena pesada 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 47 a 59, o 61 a 63 de los antes descritos.

20 65. Un vector de expresión que incluye el ácido nucleico de acuerdo con 64 antes descrito.

66. Una célula transformada con el vector de expresión de acuerdo con el 65 antes descrito.

25 67. La célula de acuerdo con el 66 antes descrito, en donde la célula se deriva a partir de un mamífero.

68. Una composición farmacéutica que comprendel complejo o

la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 45 a 63 antes descritos, como un ingrediente activo, en particular en donde el ingrediente activo es el fármaco que muestra una efectividad farmacológica en el sistema nervioso central al pasar a través de una barrera hematoencefálica.

5 69. Un péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada que tiene una afinidad por un receptor de transferrina humana, el péptido que comprende tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde el péptido se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) y (2),

10 (1) un péptido, en el cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12, en donde una combinación de las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3, pueden ser cualquier combinación, pero de preferencia es una combinación de en la cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 11, o una combinación, en la cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en

SEQ ID NO: 12, y

(2) un péptido, en el cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18, en donde una combinación de las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3, pueden ser cualquier combinación, pero de preferencia es una combinación de en la cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 13, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 15, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 17, o una combinación, en la cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 18.

70. Un péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada que tiene una afinidad por un receptor de transferrina humana, el péptido que comprende tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde el péptido se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) a (3),

(1) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 4, en

la cual las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en (1) del 69 antes descrito,

(2) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5, en la cual las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en (1) del 69 antes descrito, y

(3) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 6, en la cual las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en (2) del 69 antes descrito.

71. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada seleccionado a partir del grupo que consiste en (1) a (3) del 70 antes descrito, en donde la identidad es 85% o más.

72. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada seleccionado a partir del grupo que consiste en (1) a (3) del 70 antes descrito, en donde la identidad es 90% o más.

73. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada seleccionado a partir del grupo que consiste en (1) a (3) del 70 antes descrito, en donde la identidad es 95% o más.

74. Un péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada que tiene una afinidad por un receptor de transferrina humana, el péptido que comprende tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde el péptido se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) a (3),

(1) un péptido que incluye la secuencia de aminoácido en la cual los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ

ID NO: 4 se sustituyen, eliminan o añaden, y en la cual las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en (1) del 69 antes descrito,

(2) un péptido que incluye la secuencia de aminoácido en la cual los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5 se sustituyen, eliminan o añaden, y en la cual las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en (1) del 69 antes descrito, y

(3) un péptido que incluye la secuencia de aminoácido en la cual los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 6 se sustituyen, eliminan o añaden, y en la cual las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en (2) del 69 antes descrito.

75. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada seleccionado a partir del grupo que consiste en (1) a (3) del 74 antes descrito, en donde un número de aminoácidos sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 5.

76. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada seleccionado a partir del grupo que consiste en (1) a (3) del 74 antes descrito, en donde un número de aminoácidos sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 3.

77. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con cualquiera de 69 a 76 antes descritos, en donde el péptido tiene una afinidad por una región extracelular de un receptor de transferrina humana y una región extracelular de un receptor de transferrina de mono.

78. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el 77 antes descrito, en donde una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana y una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina de mono son 5×10^{-11} M a 5×10^{-7} M.

79. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el 77 antes descrito, en donde una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana y una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina de mono son 5×10^{-11} M a 1×10^{-8} M.

80. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el 77 antes descrito, en donde en un caso en donde un valor de una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana se designa como 1, un valor de una constante de disociación con un receptor de transferrina de mono es 1 a 10.

81. El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con el 77 antes descrito, en donde en un caso en donde un valor de una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana se designa como 1, un valor de una constante de disociación con el receptor de transferrina de mono es 3 a 10.

82. Un péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada en el cual una pluralidad de péptidos de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con cualquiera de 69 a 81 antes descritos, se unen, en donde el péptido de afinidad con receptor de

transferrina humana se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) a (3),

(1) un péptido en el cual 2 a 10 de los péptidos de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con 41 a 53 antes descritos, se unen directamente o a través de un ligador,

(2) un péptido en el cual 2 o 3 de los péptidos de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con 41 a 53 antes descritos, se unen directamente o a través de un ligador, y

(3) un péptido en el cual 2 de los péptidos de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con 41 a 53 antes descritos, se unen directamente o a través de un ligador.

83. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el 82 antes descrito, en donde cada uno de los ligadores enlazan una pluralidad de los péptidos de la región variable del anticuerpo de cadena pesada entre sí es un ligador peptídico que consiste en 1 a 60 aminoácidos.

84. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con el 83 antes descrito, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, y SEQ ID NO: 25.

85. El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena

pesada, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico consiste en la secuencia de aminoácido en la cual 2 a 10 secuencias de aminoácido cada una se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21 se configuran en serie.

86. Un complejo de fármaco-péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada en el cual un péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada y un fármaco se unen entre sí, en donde el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada es el péptido de acuerdo con cualquiera de 69 a 85 antes descritos.

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

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

89. La proteína de fusión de acuerdo con el 88 antes descrito, en donde el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada se une de manera directa o a través del ligador a la terminal C de la proteína (A) diferente.

90. La proteína de fusión de acuerdo con el 88 antes descrito, en donde el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada se

une de manera directa o a través del ligador a la terminal N de la proteína (A) diferente.

91. La proteína de fusión de acuerdo con 89 o 90 antes descrito, en donde el ligador es un ligador peptídico que consiste en 1 a 60 aminoácidos.

92. La proteína de fusión de acuerdo con el 91 antes descrito, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, y SEQ ID NO: 25.

93. La proteína de fusión de acuerdo con el 91 antes descrito, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico consiste en la secuencia de aminoácido en la cual 2 a 10 secuencias de aminoácido cada una se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21 se configuran en serie.

94. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 87 a 93 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente es una proteína derivada a partir de un humano.

95. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 87 a 94 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente

es una citocina, un factor de crecimiento o un fármaco de anticuerpo.

5 96. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 87 a 94 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente se selecciona a partir de las proteínas que se muestran en el 35 antes descrito.

 97. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 87 a 94 antes descritos, en donde la proteína (A) diferente es una enzima lisosomal, y la enzima lisosomal se selecciona a partir de las proteínas que se muestran en el 36 antes descrito.

10 98. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 87 a 94 antes descritos, en donde la seroalbúmina se une al complejo o la proteína de fusión.

 99. El complejo o la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de 87 a 94 antes descritos, en donde una región de Fc de IgG humana se une con la proteína de fusión.

15 100. Un ácido nucleico que codifica el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de acuerdo con cualquiera de 69 a 85 de los antes descritos.

 101. Un ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión de acuerdo con cualquiera de 88 a 99 de los antes descritos.

20 102. Un vector de expresión que incluye el ácido nucleico de acuerdo con 100 o 101 antes descritos.

 103. Una célula transformada con el vector de expresión de acuerdo con el 102 antes descrito.

25 104. La célula de acuerdo con el 103 antes descrito, en donde la célula se deriva a partir de un mamífero.

Efectos Ventajosos de la Invención

[0010] El péptido (péptido de afinidad hTfR) que tiene una afinidad por el receptor de transferrina humana de acuerdo con una modalidad de la presente invención puede unirse a una sustancia que apenas puede pasar o no a través de la barrera hematoencefálica, y puede permitir a la sustancia pasar a través de la barrera hematoencefálica y, en consecuencia, alcanzar el sistema nervioso central. Por lo tanto, la función de la sustancia puede mostrarse en el sistema nervioso central.

Breve Descripción De Las Figuras

[0011] La Fig. 1 es una gráfica que muestra valores cuantitativos de péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab y trastuzumab contenidos en el cerebelo de un ratón del tipo silvestre 6 horas después de la administración de cada uno del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab y el trastuzumab. (1) representa el valor cuantitativo de trastuzumab, (2) representa el valor cuantitativo de péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1, (3) representa el valor cuantitativo del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 3, y (4) representa el valor cuantitativo del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab (producto de referencia). El eje vertical indica la cantidad (μg) de estas sustancias contenidas por peso húmedo (g).

La Fig. 2 es una fotografía en sustitución de un dibujo que muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica de un anticuerpo anti-hTfR de un cerebelo de un ratón del tipo silvestre 6 horas después de la administración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab. (a) muestra el resultado de la administración de trastuzumab, (b) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad con hTfR-

trastuzumab 1, (c) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 3, y (d) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab (producto de referencia). Cada fotografía ha sido tomada con un aumento de 40X.

La Fig. 3 es una gráfica que muestra valores cuantitativos de péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab y trastuzumab contenidos en el cerebelo de un ratón knock-in 6 horas después de la administración de cada uno del péptido de afinidad hTfR-trastuzumab y el trastuzumab. (1) representa el valor cuantitativo de trastuzumab, (2) representa el valor cuantitativo de péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2, y (3) representa el valor cuantitativo del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 3. El eje vertical indica la cantidad (μg) de estas sustancias contenidas por peso húmedo (g).

La Fig. 4 es una fotografía en sustitución de un dibujo que muestra el resultado de la tinción inmunohistoquímica de un anticuerpo anti-hTfR de un cerebelo de un ratón knock-in de hTfR 6 horas después de la administración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab. (a) muestra el resultado de la administración de trastuzumab, (b) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2, y (c) muestra el resultado de la administración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 3. Cada fotografía ha sido tomada con un aumento de 40X.

Descripción Detallada De La Invención

[0012] Un monómero de un anticuerpo de varios mamíferos que incluyen un ser humano y un ratón, se forma como un heterotetrámero, en el cual dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras se unen de manera

covalente entre sí por medio de un enlace de disulfuro. Cada cadena tiene una región, en la cual las secuencias de aminoácido de los diferentes anticuerpos difieren en la terminal N, y esta región se refiere a una región variable. En la región variable de la cadena pesada, existes tres regiones de determinación complementarias que contribuyen de manera considerable a la unión específica con un antígeno. Las tres regiones de determinación complementarias son referidas como CDR1, CDR2 y CDR3 de la terminal N. De igual forma, en la cadena ligera, existen tres regiones de determinación complementarias que contribuyen de manera considerable con la unión específica con el antígeno, y estas tres regiones de determinación complementarias son referidas como CDR1, CDR2 y CDR3 de la terminal N.

[0013] Una cadena pesada y una cadena ligera forman un par y se unen de manera específica con un antígeno. Esto es, la especificidad con el antígeno se determina de manera considerable por medio de las secuencias de aminoácido de las 6 CDR de las 3 CDR de la cadena pesada y las 3 CDR de la cadena ligera. Dado que el monómero del anticuerpo de varios mamíferos tiene dos pares de una cadena pesada y una cadena ligera, el monómero de un anticuerpo tiene dos regiones que pueden unirse con el antígeno.

[0014] En la región variable, una región diferente a la CDR es referida como una región estructural (FR). La cadena pesada y la cadena ligera cada una tienen cuatro FR, las cuales son referidas como FR1, FR2, FR3 y FR4 de la terminal N. La CDR está presente entre la FR en la región variable.

[0015] La FR1 es una región de la terminal N de una región variable del

anticuerpo de cadena pesada a un aminoácido adyacente a la terminal N de la CDR1. La FR2 es una región entre CDR1 y CDR2. La FR3 es una región entre CDR2 y CDR3. La FR4 es una región de un aminoácido adyacente a la terminal C de CDR3 a la terminal C de la región variable del anticuerpo de cadena pesada.

[0016] Con respecto al mono de los anticuerpos antes descritos de varios mamíferos (anticuerpos normales), existe un anticuerpo (anticuerpo de cadena pesada) que no tiene una cadena ligera e incluye solo una cadena pesada. Por ejemplo, un anticuerpo de cadena pesada (hcIg) producido por medio de un animal camelidae y un nuevo receptor de anticuerpo de cadena pesada de inmunoglobulina (IgNAR) producido por peces cartilaginosos, como, por ejemplo, un tiburón. Un anticuerpo de cadena pesada camelidae (hcIg) es un homodímero en el cual dos cadenas pesadas se unen de manera covalente entre sí por medio de un enlace de disulfuro. Cada cadena pesada tiene una región variable en el terminal N, y la región variable tiene tres regiones de determinación complementarias (CDR) que contribuyen de manera considerable a la unión específica con un antígeno. Las tres regiones de determinación complementarias son referidas como CDR1, CDR2 y CDR3 de la terminal N. Ya que cada cadena pesada que constituye la hcIg puede unirse de manera específica con un antígeno, aunque sea un monómero, una hcIg tiene dos regiones, en las cuales puede unirse un antígeno en una molécula. En la región variable, una región que no sea la CDR es referida como una región estructural (FR), y la disposición de la hcIg es el mismo que el de un anticuerpo normal.

[0017] El IgNAR también es un homodímero en el cual dos cadenas

pesadas se unen de manera covalente entre sí por medio de una unión de disulfuro, de igual forma que la hIg. Cada cadena pesada tiene una región variable en el terminal N, y la región variable tiene tres regiones de determinación complementarias (CDR) que contribuyen de manera considerable a la unión específica con un antígeno. Las tres regiones de determinación complementarias son referidas como CDR1, CDR2 y CDR3 de la terminal N. Ya que cada cadena pesada que constituye el IgNAR puede unirse de manera específica con un antígeno, aunque sea un monómero, un IgNAR tiene dos regiones, en las cuales puede unirse un antígeno en una molécula. En la región variable, una región que no sea la CDR es referida como una región estructural (FR), y la disposición del IgNAR es el mismo que el de un anticuerpo normal.

[0018] La región estructural y la CDR en la región variable de la hIg o IgNAR pueden especificarse a partir de una base de datos de ADN que incluya una secuencia genética de un anticuerpo de linaje celular reproductivo. Por ejemplo, la secuencia de ADN de linaje celular y la secuencia de aminoácido del gen de región variable de cadena pesada pueden seleccionarse a partir de la base de datos de secuencia de línea de célula reproductiva humana “VBase” (disponible en www.mrccpe.cam.ac.uk/vbase en el Internet). Además, la región estructural y la CDR también puede especificarse a partir de las secuencias de ADN y secuencias de aminoácido descritas en los documentos publicados, por ejemplo, “Kabat EA. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Edición, Departamento de EE. UU. de los Servicios Humanos y de Salud, NIH Publicación No. 91-3242 (1991)”, “Tomlinson IM. J. fol. Biol. 227. 776-98 (1992)”, “Cox JPL. Eur. J

Immunol. 24:827-836 (1994)”, entre otros. Por ejemplo, dado que el gen de la región variable de la cadena pesada humana es homólogo a la región variable de la hclg, la región estructural y la CDR de la hclg también pueden especificarse con base en la información del gen de la región variable de la cadena pesada humana. Un método para especificar la región estructural de la CDR no se limita de manera particular.

[0019] Sin embargo, sin limitarse a esto, en cada región especificada como la región FR, (1) una región que incluye 1 a 5 aminoácidos de la terminal N y/o 1 a 5 aminoácido en la terminal C, (2) una región incluyendo 1 a 3 aminoácidos de la terminal N y/o 1 a 3 aminoácidos en la terminal C, o (3) una región que incluye 1 o 2 aminoácidos de la terminal N y/o 1 o 2 aminoácidos en la terminal C pueden incluirse en la región CDR sin estar incluido en la región FR. En general, incluso una región que se considera como FR puede incluirse en la CDR siempre que se considere como estando involucrada en el mantenimiento estructural de la CDR o la unión al antígeno y teniendo una función para determinar de manera considerable la complementariedad del anticuerpo. Por otro lado, en cada región especificada como la región CDR, (1) una región que incluye 1 a 5 aminoácidos de la terminal N y/o 1 a 5 aminoácido en la terminal C, (2) una región incluyendo 1 a 3 aminoácidos de la terminal N y/o 1 a 3 aminoácidos en la terminal C, o (3) una región que incluye 1 o 2 aminoácidos de la terminal N y/o 1 o 2 aminoácidos en la terminal C también pueden incluirse en la región FR sin estar incluido en la región CDR. En general, esta invención incluso incluye una región considerada como CDR en la FR, siempre que la región no se involucre

en el mantenimiento de la estructura de la CDR o en la unión con un antígeno y no tenga una función considerable en la determinación de la complementariedad del anticuerpo.

[0020] Una región constante está presente en la terminal C de la región variable del anticuerpo de cadena pesada a través de una región bisagra. Una región constante también está presente en la terminal C de la región variable de IgNAR. Estas regiones constantes apenas contribuyen a la unión específica del anticuerpo de cadena pesada con el antígeno.

[0021] El anticuerpo de cadena pesada es homodímero unido de manera covalente en una región bisagra por medio de un enlace de disulfuro. Sin embargo, el anticuerpo de cadena pesada no necesita ser un homodímero con el fin de unirse al antígeno, y cada cadena pesada que constituye el anticuerpo de cadena pesada puede unirse solo al antígeno.

[0022] El monómero de la cadena pesada que constituye el anticuerpo de cadena pesada puede obtenerse al eliminar un residuo de cisteína que forme un enlace de disulfuro en la secuencia de aminoácido de la región bisagra de la cadena pesada o al sustituir el residuo de cisteína con otro aminoácido. Dicho monómero de una cadena pesada puede producirse como una proteína recombinante haciendo uso de una técnica recombinante de gen. En la presente especificación, dicha cadena pesada se refiere a un “anticuerpo de cadena pesada única”. El anticuerpo de cadena pesada única se incluye en el anticuerpo de cadena pesada siempre que pueda unirse al antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. El anticuerpo de cadena pesada única puede ser un anticuerpo en el cual los anticuerpos de cadena pesada única se enlazan en serie. Por ejemplo, en el anticuerpo de cadena pesada única, la

terminal C de un anticuerpo de cadena pesada se une con la terminal N de otro anticuerpo de cadena pesada de manera directa o a través del ligador peptídico. El número de anticuerpos de cadena pesada única que van a enlazarse es 2 a 10, por ejemplo, 2. Como la secuencia del ligador peptídico, puede adaptarse la secuencia descrita en la presente memoria descriptiva. Dicho anticuerpo en el cual una pluralidad de anticuerpos de cadena pesada única se enlaza entre sí también se incluye en el anticuerpo de cadena pesada única.

[0023] Una región variable de cada cadena pesada que constituye el anticuerpo de cadena pesada puede unirse con un antígeno incluso en un caso en donde no exista una región bisagra y/o una región constante. Una proteína que consiste en dicha región variable puede producirse como una proteína recombinante, por ejemplo, al construir un gen que codifica solo la secuencia de aminoácido de la región de la cadena pesada del anticuerpo de cadena pesada, que incorpora el gen a un vector de expresión, y que transfecta un vector de expresión, y que transfecta el vector a la célula huésped.

[0024] En la presente memoria descriptiva, en aras de la practicidad, la proteína que incluye una parte o la totalidad de una región variable de una cadena pesada que constituye el anticuerpo de cadena pesada y que tiene una afinidad por un antígeno, se considerará como incluida en el anticuerpo de cadena pesada. Además de la proteína que incluye una parte o la totalidad de la región variable de la cadena pesada que constituye el anticuerpo de cadena pesada, la proteína que incluye (1) una parte o la totalidad de una región bisagra o (2) una parte de una región constante de la cadena pesada además de la región bisagra se incluye

también. El anticuerpo de cadena pesada se deriva a partir de hcIg o a partir de IgNAR. Un monómero de dicho anticuerpo de cadena pesada también se incluye en el anticuerpo de cadena pesada única.

[0025] El anticuerpo de cadena pesada derivado a partir de la hcIg

- 5 incluye (1h) un anticuerpo que consiste en la totalidad o una parte de una región variable de una cadena pesada, (2h) un anticuerpo que consiste en la totalidad o una parte de la región variable y una parte de una región bisagra de la cadena pesada, (3h) un anticuerpo que consiste en la totalidad de la región variable y una región bisagra de la cadena pesada,
- 10 y (4h) un anticuerpo que incluye una parte de una región constante de la cadena pesada además de una región variable y una región bisagra de una cadena pesada. Aquí, una parte de la región constante incluida en el anticuerpo de cadena pesada es, por ejemplo, una porción correspondiente a una parte o la totalidad de C_H2 de la cadena pesada.
- 15 El anticuerpo de cadena pesada derivado a partir de la IgNAR incluye (1I) un anticuerpo que consiste en la totalidad o una parte de una región variable de una cadena pesada, (2I) un anticuerpo que consiste en la región variable y una parte de una región bisagra de la cadena pesada, (3I) un anticuerpo que consiste en la totalidad de la región variable y una
- 20 región bisagra de la cadena pesada, y (4I) un anticuerpo que incluye una parte de una región constante de la cadena pesada además de una región variable y una región bisagra de una cadena pesada. Aquí, una parte de la región constante incluida en el anticuerpo de cadena pesada es, por ejemplo, una porción correspondiente a una parte o la totalidad de C_H2 de
- 25 la cadena pesada. En la presente memoria descriptiva, las proteínas (1h) a (4h) que incluye la región variable de anticuerpo de cadena pesada

derivado a partir de la hIg, y las proteínas (1I) a (4I) que incluye la región variable de anticuerpo de cadena pesada derivada a partir de la IgNAR son referidos en su conjunto como un péptido de dominio variable de anticuerpo de cadena pesada (péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada). Por lo tanto, el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada incluye un péptido en el cual dos cadenas peptídicas se unen entre sí por medio de un enlace de disulfuro y dos sitios de unión a un antígeno están presentes, y un péptido que consiste en una cadena peptídica en la cual hay un sitio de unión al antígeno.

[0026] En la presente memoria descriptiva, el anticuerpo de cadena pesada reconocer una molécula presente en la superficie de una célula endotelial vascular, en particular una célula endotelial vascular cerebral, como un antígeno. Las especies de la célula endotelial vascular y la célula endotelial vascular cerebral no se limita de manera particular, sino que de preferencia es una célula humana. La molécula presente sobre la superficie de estas células y la cual será reconocida como un antígeno por el anticuerpo de cadena pesada, de preferencia es un receptor de transferrina (TfR), un receptor de insulina (IR), un receptor de leptina, un receptor de lipoproteína, un receptor de IGF, OATP-F, un transportador de anión orgánico, MCT-8, o un transportador de monocarboxilato, con mayor preferencia TfR o un receptor de insulina, y con aún mayor preferencia TfR.

[0027] El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada que tiene una afinidad por una molécula presente sobre la superficie de una célula endotelial vascular, en particular una célula endotelial vascular cerebral es referida como un péptido de la región variable del anticuerpo

de cadena pesada de barrera hematoencefálica (péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de BHE). Además, el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de BHE y todos los péptidos derivados a partir del péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de BHE, el cual tiene una afinidad por una molécula presente en la superficie de una célula endotelial vascular, son referidos como un péptido de afinidad con BHE. En la presente memoria descriptiva, la proteína de (1h) o (2h) antes descritos, la cual incluye una región variable de anticuerpo de cadena pesada derivada a partir de hC1g y que consiste en una cadena peptídica, es referida como un péptido de dominio variable único de inmunoglobulina (péptido de región variable única de inmunoglobulina). El péptido de dominio variable único de inmunoglobulina contenido en el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de BHE también puede ser referido de manera particular como un péptido de dominio variable único de inmunoglobulina de BHE. En la presente invención, VHH, un dominio de VHH, un anticuerpo VHH, y Nanobody (marca de Ablynx N.V.) se incluyen en el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina y se utilizan de manera intercambiable dependiendo del contexto. Así, por ejemplo, el VHH que tiene una afinidad por TfR se incluye en el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina de BHE.

[0028] El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada que tiene una afinidad por anti-hTfR es referido como un péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR. Además, la totalidad de los péptidos que tienen una afinidad por anti-hRfR, los cuales se derivan a partir del péptido de la región variable del anticuerpo

de cadena pesada de anti-hTfR y el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR, son referidos como un péptido de afinidad con hTfR. El VHH que tiene una afinidad por hTfR se incluye particularmente en el péptido de afinidad con hTfR. Lo mismo aplica al VHH que tiene una afinidad para las otras moléculas presentes en la superficie de las células, y, por ejemplo, el VHH que tiene una afinidad por hIR se incluye en el péptido de afinidad con hIR. El número de aminoácidos que constituye el péptido de afinidad con BHE no se limita de manera particular, pero por lo regular 80 a 200, de preferencia 80 a 150, con mayor preferencia 100 a 130, y con aún mayor preferencia 110 a 125. Por ejemplo, el péptido de afinidad con BHE está compuesto de 113, 115, 119 o 120 aminoácidos. El término “péptido” en la presente memoria descriptiva es sinónimo de “polipéptido” o “proteína”, y puede reemplazarse de manera adecuada entre sí. En lo sucesivo, las características o elementos parecidos del péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada que tiene una afinidad por un receptor de transferrina humana (hTfR) se describirá en detalle como un ejemplo, pero la descripción del mismo por lo general puede aplicarse al péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada que tiene una afinidad por otra molécula presente en la superficie de las células.

[0029] Por lo regular, el anticuerpo consiste en una cadena ligera y una cadena pesada, mientras que el VHH consiste en una cadena pesada. Por lo tanto, puede simplificarse una etapa de fabricación de una proteína de fusión en la cual el VHH, como el péptido de afinidad con hTfR, se une a una proteína (A) diferente. Por ejemplo, en un caso en donde un

anticuerpo normal se utiliza como el péptido de afinidad con hTfR, es necesario expresar dos proteínas, pero en un caso con el VHH, es suficiente para expresa una proteína.

[0030] El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada que tiene una afinidad por un receptor de transferrina humana es referido como un péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR. En la presente memoria descriptiva, la proteína de (1h) o (2h) antes descritos, la cual incluye una región variable de anticuerpo de cadena pesada derivada a partir de hIg y que consiste en una cadena peptídica, es referida como un péptido de dominio variable único de inmunoglobulina. El péptido de dominio variable único de inmunoglobulina que tiene una afinidad por un receptor de transferrina humana (hTfR) en particular es un péptido de dominio variable único de inmunoglobulina de hTfR o un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana (péptido de afinidad con hTfR). El péptido de afinidad con hTfR es un péptido de preferencia compuesto por 100 a 130 aminoácido y con mayor preferencia 110 a 125 aminoácidos. Por ejemplo, el péptido de afinidad con hTfR está compuesto de 113, 115 o 119 aminoácidos. Además, el VHH, el dominio de VHH, el anticuerpo de VHH, y Nanobody que tienen una afinidad por hTfR son cada uno referidos como hTfR-VHH, dominio de hTfR-VHH, anticuerpo de hTfR-VHH y hTfR-Nanobody.

[0031] El péptido de afinidad con hTfR también incluye, además de un péptido de los tipos descritos como (1h) a (4f) y (1I) a (4I) antes descritos, un péptido en el cual la mutación, como, por ejemplo, sustitución, eliminación o adición, se aplica al mismo, siempre que el péptido tenga

una afinidad por hTfR. Además, el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina de hTfR también incluye, además de un péptido de los tipos descritos como (1h) o (2h) antes descritos, un péptido en el cual la mutación, como, por ejemplo, sustitución, eliminación o adición, se aplica al mismo, siempre que el péptido tenga una afinidad por hTfR. La mutación del péptido de dominio variable único de inmunoglobulina de hTfR se describirá en detalle a continuación.

[0032] En la presente invención, el término “receptor de transferrina humana” o “hTfR” se refiere a una proteína de membrana que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 1. El anticuerpo de anti-hTfR de la presente invención, en una modalidad de la presente invención, se une de manera específica a una porción del residuo de la cisteína en la posición 89 de la terminal N con la fenilalanina en la terminal C en la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 1 (región extracelular de hTfR), pero la presente invención no se limita a la misma. Además, en la presente invención, el término “receptor de transferrina de mono” o “TfR de mono” en particular se refiere a una proteína de membrana que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 2 derivado del mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Además, en la presente invención, el término “receptor de transferrina de ratón” o “TfR de ratón” en particular se refiere a una proteína de membrana que tiene una secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 3 derivada de un ratón. El anticuerpo de anti-hTfR de la presente invención, en una modalidad de la presente invención, se une a una porción del residuo de la cisteína en la posición 89 de la terminal N con la fenilalanina en la terminal C en la secuencia de aminoácido establecida

en la SEQ ID NO: 2 (región extracelular de TfR de mono) y/o una porción del residuo de cisteína en la porción 89 de la terminal N con la fenilalanina en la terminal C en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 3 (región extracelular de TfR de ratón), pero la presente invención no se limita a la misma.

[0033] Una pluralidad de los péptidos de afinidad con hTfR también puede unirse directamente o a través de un ligador peptídico. En dicho caso, la pluralidad de los péptidos de afinidad con hTfR que van a unirse entre sí pueden tener la misma secuencia de aminoácido, o pueden tener diferentes secuencias de aminoácido. El número de los péptidos de afinidad con hTfR que van a unirse no se limita de manera particular, sino que es, por ejemplo, 2 a 10, 2 a 5, 2, 3, entre otros. Al unir la pluralidad de péptidos de afinidad con hTfR, es posible para impartir propiedades, como, por ejemplo, mejorar la afinidad por anti-hTfR. En la presente memoria descriptiva, un péptido en el cual una pluralidad de péptidos de afinidad con hTfR se enlazan en esta forma es referido como un péptido de afinidad con hTfR de tipo tándem. El péptido de afinidad con hTfR de tipo tándem se incluye en el péptido de afinidad con hTfR. Lo mismo puede decirse del péptido de dominio variable único de inmunoglobulina y el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR.

[0034] El péptido de afinidad con hTfR también puede obtenerse como una proteína recombinante por medio del mismo método.

(1a) Un receptor de transferrina humana recombinante (rhTfR) se produce haciendo uso de una célula a la cual se ha transferido un vector de expresión que incorpora el gen de hTfR.

(2a) Los animales Camelidae capaces de producir hIg o peces capaces de producir IgNAR, en particular peces cartilaginosos, como, por ejemplo, un tiburón, se inmunizan con rhTfR.

(3a) Las células que produce un anticuerpo se obtiene a partir de ser vivo inmunizado haciendo uso de rhTfR. Aquí, ya que las células que producen anticuerpos están presentes particularmente en la sangre periférica, médula ósea, un bazo, entre otros, las células en la sangre periférica, células derivadas de la médula ósea, células del bazo, entre otras, se agrupan como las células productoras de anticuerpos.

(4a) El ADNc se sintetiza a partir de ARNm extraída a partir de la célula productor de anticuerpos por medio de una reacción de transcripción inversa.

(5a) La reacción de PCR se lleva a cabo haciendo uso del ADNc como una plantilla para amplificar un fragmento de ADN que contiene un gen que codifica una región variable de anticuerpo de cadena pesada.

(6a) Un fragmento de ADN que codifica una región variable de anticuerpo de cadena pesada se incorpora a un vector de expresión, y una célula huésped se transforma con el vector de expresión para obtener células de expresión de la región variable del anticuerpo de cadena pesada.

(7a) De las células de expresión de la región variable del anticuerpo de cadena pesada, se selecciona una célula que expresa la región variable del anticuerpo de cadena pesada que reconoce el hTfR (célula de expresión de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR). Un gen que codifica una región variable de anticuerpo de cadena pesada que reconoce el hTfR también puede amplificarse al

realizar una reacción de PCR y se aísla de la célula seleccionada en la misma.

(8a) La célula de expresión de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR se cultiva, y el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR recombinante se expresa en el medio de cultivo o en la célula.

(9a) El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR recombinante expresado se purifica.

[0035] La célula de expresión de la región variable del anticuerpo de cadena pesada obtenido en la Etapa (6a) de adquisición del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR que reconoce el hTfR antes descrito no expresa de manera necesaria la región variable del anticuerpo de cadena pesada que reconoce el hTfR. Por lo tanto, una etapa para seleccionar una célula que produce una región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene una característica deseada (afinidad por hTfR) de la célula de expresión de la región variable del anticuerpo de cadena pesada obtenido en la Etapa (6a), esto es, la Etapa (7a) es necesaria. Como un método para seleccionar una célula que produce el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR, un método descrito a continuación es efectivo.

[0036] La célula de expresión de la región variable del anticuerpo de cadena pesada obtenido en la Etapa (6a) se siembra en una placa de 96 pocillos, de forma que una célula se incluya generalmente en un pocillo, y se cultivó, y posteriormente se recolecta un sobrenadante de cultivo de cada pocillo. El hTfR recombinante se añadió a la placa y se mantuvo en la misma, y posteriormente el sobrenadante de cultivo recolectado se

añade, con lo cual la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR contenido en el sobrenadante de cultivo se une al hTfR recombinante sobre la placa. Después, la placa se lavó después de retirar el sobrenadante de cultivo de la placa para retirar el anticuerpo que no se une al hTfR recombinante. Después, se mide la cantidad del anticuerpo que se mantuvo en la placa. De acuerdo con este método, entre más alta sea la afinidad del anticuerpo contenido en el sobrenadante de cultivo de la célula productor de anticuerpos añadido a la placa para hTfR, mayor será la cantidad del anticuerpo mantenido en la placa. Por lo tanto, se mide la cantidad del anticuerpo mantenido en la placa, y una célula correspondiente a la placa en la cual se mantiene una cantidad más grande del anticuerpo puede seleccionarse como una línea celular que produce un péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR que tiene una afinidad relativamente más alta por hTfR. El ARNm extraído de la línea celular seleccionada en esta forma se transcribe de manera inversa para obtener ADNc, y una reacción de PCR se lleva a cabo haciendo uso del ADNc como una plantilla, con lo cual un fragmento de ADN que contiene un gen que codifica el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR puede amplificarse y aislarse.

[0037] Como otro método para obtener el anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR como una proteína recombinante, existe un método que incluye las siguientes etapas. Este método incluye una etapa para presentar la región variable del anticuerpo de cadena pesada codificada por el gen que codifica la región variable del anticuerpo de cadena pesada en un fago para seleccionar un fago que presenta la región variable del

anticuerpo de cadena pesada que tiene una propiedad deseada. Dicha etapa se llama un método de visualización de fago, y es una técnica conocida y descrita en las publicaciones internacionales de las solicitudes no examinadas (WO1997/09436A y WO1995/11317A). El método para obtener el anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR que reconoce un hTfR como una proteína recombinante al aplicar el método de visualización de fago incluye, por ejemplo, las Etapas (1b) a (9b). El péptido de afinidad con hTfR también puede obtenerse como una proteína recombinante por medio del mismo método.

10 (1b) Un receptor de transferrina humana recombinante (rhTfR) se produce haciendo uso de una célula a la cual se ha transferido un vector de expresión que incorpora el gen de hTfR.

15 (2b) Los animales Camelidae capaces de producir hIg o peces capaces de producir IgNAR, en particular peces cartilaginosos, como, por ejemplo, un tiburón, se inmunizan con rhTfR.

20 (3b) Las células que produce un anticuerpo se obtiene a partir de ser vivo inmunizado haciendo uso de rhTfR. Aquí, ya que las células que producen anticuerpos están presentes particularmente en la sangre periférica, médula ósea, un bazo, entre otros, las células en la sangre periférica, células derivadas de la médula ósea, células del bazo, entre otras, se agrupan como las células productoras de anticuerpos.

 (4b) El ADNc se sintetiza a partir de ARNm extraída a partir de la célula productor de anticuerpos por medio de una reacción de transcripción inversa.

25 (5b) La reacción de PCR se lleva a cabo haciendo uso del ADNc como una plantilla para amplificar un fragmento de ADN que contiene

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

(6b) Un fragmento de ADN que codifica una región variable de anticuerpo de cadena pesada se incorpora a un fagémido, el fagémido se transfecta a una célula huésped, y posteriormente la célula huésped se cultivó para liberar un fago que tiene la región variable de anticuerpo de cadena pesada en una superficie de cápside en un medio.

(7b) Una solución que contiene el fago recolectado se aplica a una columna llena con un portador que mantiene el rhTfR, y un fago que tiene una región variable de anticuerpo de cadena pesada, el cual tiene una afinidad por rhTfR, en una superficie de cápside se une con la columna. Después del lavado de la columna, el fago unido al hTfR se eluye de la columna. De manera alternativa, una solución que contiene el fago recolectado se aplica a una placa que mantiene el rhTfR, y un fago que tiene una región variable de anticuerpo de cadena pesada, el cual tiene una afinidad por rhTfR, en una superficie de cápside se une con la placa.

(8b) Solo los fagos que presenta una región variable de anticuerpo de cadena pesada que reconoce hTfR, el cual se mantiene en una columna o placa, se recolecta, y un fagémido contenido en el fago se utiliza como una plantilla para amplificar un gen que codifica la región variable del anticuerpo de cadena pesada que reconoce el hTfR por medio de una reacción de PCR.

(9b) El gen amplificado se incorpora a un vector de expresión, y una célula huésped se transforma con el vector de expresión para obtener células de expresión de la región variable del anticuerpo de cadena pesada que reconoce al hTfR.

(10b) La célula de expresión del péptido de la región variable del

anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR se cultiva, y el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR recombinante se expresa en el medio de cultivo o en la célula.

(11b) El péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR recombinante expresado se purifica.

[0038] En las Etapas (1b) a (3b) del método de visualización de fago antes descrito, es necesario retirar las células productoras de anticuerpos del ser viviente inmunizado con rhTfR. De manera alternativa, un conjunto de ARNm obtenido a partir de una célula productor de anticuerpos de un ser viviente capaz de expresa un anticuerpo de cadena pesada o fragmentos de ADN sintetizados haciendo uso del ARNm como una plantilla puede prepararse con antelación, y los fragmentos de ADN que contiene un gen que codifica una región variable de anticuerpo de cadena pesada también puede amplificarse haciendo uso del fragmento de ADN como una plantilla. De acuerdo con el método de visualización de fago, por ejemplo 1×10^{10} de fagos pueden visualizarse en una exhibición, de forma que pueda seleccionarse un fago que presenta una región variable de anticuerpo de cadena pesada que reconoce hTfR incluso de las células de un animal no inmune. En este caso, no es necesario inmunizar un ser vivo, y no es necesario sacar una célula productor de anticuerpos del ser vivo.

[0039] En la Etapa (7b) se selecciona un fago que representa una región variable de anticuerpo de cadena pesada que reconoce rhTfR. Aquí, al ajustar las condiciones de unión del fago con la columna (o placa) y/o las condiciones de lavado de la columna (o placa), puede ajustarse la afinidad del fago seleccionado para rhTfR. Además, al repetir la Etapa (7b)

mientras gradualmente se hacen más graves las condiciones, un fago que tiene mayor afinidad por rhTfR se selecciona cada vez que la etapa se repite, de forma que solo puede obtenerse de manera eficiente el fago que presenta una región variable de anticuerpo de cadena pesada que tengan

5 alta afinidad por rhTfR. Además, la mutación puede incorporarse en el genoma en un proceso de replicación del genoma del fago. En esta forma, se cambia la afinidad de la región variable del anticuerpo de cadena pesada codificado en el genoma de fago por rhTfR, de forma que al repetir la Etapa (7), existe una posibilidad de que un anticuerpo que

10 tiene una afinidad más alta por rhTfR se obtenga al incorporar de manera aleatoria una mutación en el genoma.

[0040] La etapa en un caso en donde la Etapa (7b) se repite es, por ejemplo, una etapa que muestra el siguiente (7b').

(7b') Un medio de cultivo que contiene los fagos recolectados se

15 aplica a una columna llena con un portador que mantiene el rhTfR, y un fago que presenta una región variable de anticuerpo de cadena pesada que reconoce que rhTfR se une con la columna. De manera alternativa, una solución que contiene el fago recolectado se aplica a una placa que mantiene el rhTfR, y un fago que tiene una región variable de anticuerpo

20 de cadena pesada, el cual tiene una afinidad por rhTfR, en una superficie de cápside se une con la placa. Después del lavado de la columna o la placa, un fago que presenta una región variable de anticuerpo de cadena pesada que reconoce hTfR se eluye de la columna o la placa. El fago eluido se permite infectar las células huéspedes, y posteriormente las

25 células huéspedes se cultivan, y el fago que presenta una región variable de anticuerpo de cadena pesada sobre una superficie se recolecta en el

medio de cultivo. El medio de cultivo que contiene el fago recolectado se aplica en una cromatografía en columna llena con un portador que lleva rhTfR, o se añade a la placa que contiene rhTfR. En la Etapa (7b'), el genoma de fago también puede mutarse de manera activa al poner el facto
5 en contacto con un mutágeno o añadir un mutágeno a un medio de cultivo de la célula huésped infectada con el fago. Al irradiar el fago o la célula huésped infectada con el fago con ondas electromagnéticas, como, por ejemplo, rayos ultravioletas y rayos gamma, una mutación también puede introducirse de manera activa en el genoma de fago.

10 [0041] Cualquier etapa de las Etapas (1a) a (9a) y las Etapas (1b) a (11b) también puede incluir una etapa para aislar un gen que codifica la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR. También es posible traducir la secuencia de nucleótido del gen que codifica el anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR asilada a una secuencia de
15 aminoácido que incluye la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR, y para sintetizar de manera artificial un fragmento de ADN que codifica esta secuencia de aminoácido. En un caso en donde el fragmento de ADN se sintetiza de manera artificial, el fragmento de ADN puede sintetizarse al seleccionar un codón para expresar un gen
20 en una célula huésped. Al transferir un vector de expresión en el cual dicho fragmento de ADN se ha incorporado a una célula huésped, puede aumentarse el nivel de expresión del péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR en la célula huésped. El nivel de expresión del péptido de afinidad con rhTfR también puede
25 aumentarse en la misma forma.

[0042] Además, la célula utilizada como la célula huésped en la etapa

antes descrita no se limita particularmente siempre que la célula sea una célula que pueda expresar un péptido que incluye la región variable de anticuerpo de cadena pesada al transferir un vector de expresión en el cual un gen que codifica la región variable de anticuerpo de cadena pesada se incorpora, a pesar de si la célula es una célula procariota o una célula eucariota, y en particular, *Escherichia coli*, las células CHO derivadas del ovario de un hámster chino, o células NS/0 derivados del mieloma de un ratón es preferible. Además, conforme se utiliza el vector de expresión para incorporar y expresar un gen que codifica la región variable de anticuerpo de cadena pesada, un vector de expresión puede utilizarse sin una limitación particular, siempre que el vector de expresión pueda expresar un péptido que incluya la región variable del anticuerpo de cadena pesada en un caso de ser transferido a una célula huésped. El gen incorporado en el vector de expresión se configura corriente abajo de una secuencia de ADN capaz de regular la frecuencia de transcripción del gen en la célula huésped (sitio de control de expresión genética). Los ejemplos del sitio de control de expresión genética que puede utilizarse en la presente invención incluyen un promotor derivado a partir de citomegalovirus, un promotor temprano de SV40, un promotor del factor de elongación-1 α humano (EF-1 α) y un promotor de ubiquitina C humana, entre otros.

[0043] La secuencia de aminoácido de la región variable en el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR obtenido por la etapa antes descrita incluye una secuencia de aminoácido de cuatro FR y tres CDR, esto es, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4, básicamente de la terminal N. Sin embargo, la presente

invención no se limita a lo anterior, y siempre que pueda unirse de manera específica con hTfR, la secuencia de aminoácido de la región variable puede ser una secuencia de aminoácido en la cual una parte o la totalidad de FR1 se elimina, una secuencia de aminoácido en la cual una parte o la totalidad de FR4 se elimina, o una secuencia de aminoácido en la cual una parte o la totalidad de FR1 se elimina y una parte o la totalidad de FR4 se elimina. Las secuencias de aminoácido en las cuales una parte de la región de FR se elimina puede incluirse en la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR. Los mismo aplica al péptido de afinidad con hTfR.

[0044] Los ejemplos adecuados del péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR en una modalidad de la presente invención incluye un péptido que incluye secuencias de aminoácido de un péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR 1 a 3. Los péptidos de afinidad con hTfR 1 a 3 cada uno incluye una secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 4 a 6. Las secuencias de aminoácido establecidas en la SEQ ID NO: 4, 5 y 6 son todas secuencias de aminoácido de una región variable de anticuerpo de cadena pesada. La totalidad de los péptidos de afinidad con hTfR 1 a 3 incluye una secuencia de aminoácido de cuatro FR y tres CDR, que es, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 de la terminal N. La totalidad de los péptidos de afinidad con hTfR 1 a 6 se incluye en el péptido de afinidad con hTfR.

[0045] La CDR1 del péptido de afinidad con hTfR 1 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 u 8, la CDR2 de la misma es una región que incluye la secuencia de aminoácido

establecida en la SEQ ID NO: 9 u 10, y la CDR3 de la misma es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 11 o 12. En el péptido de afinidad con hTfR 1, cada una de las secuencias de aminoácido de CDR puede combinarse de manera arbitraria. Por ejemplo, las secuencias de aminoácido pueden combinarse de forma que la CDR1 sea una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 7, la CDR2 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 9, y la CDR3 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 11 u, la CDR1 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 8, la CDR2 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 10, y la CDR3 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 12. Además, la CDR2 además puede incluir la secuencia de aminoácido de VKG en la terminal C de la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 10. Además, cualquier CDR puede consistir en estas secuencias de aminoácido.

[0046] La CDR1 del péptido de afinidad con hTfR 2 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 u 8, la CDR2 de la misma es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 9 u 10, y la CDR3 de la misma es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 11 o 12. En el péptido de afinidad con hTfR 2, cada una de las secuencias de aminoácido de CDR puede combinarse de manera arbitraria. Por ejemplo, las secuencias de aminoácido pueden

combinarse de forma que la CDR1 sea una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 7, la CDR2 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 9, y la CDR3 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 11 u, la CDR1 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 8, la CDR2 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 10, y la CDR3 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 12. Además, la CDR2 además puede incluir la secuencia de aminoácido de VKG en la terminal C de la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 10. Además, cualquier CDR puede consistir en estas secuencias de aminoácido.

[0047] La CDR1 del péptido de afinidad con hTfR 3 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 13 u 14, la CDR2 de la misma es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 15 u 16, y la CDR3 de la misma es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 17 o 18. En el péptido de afinidad con hTfR 3, cada una de las secuencias de aminoácido de CDR puede combinarse de manera arbitraria. Por ejemplo, las secuencias de aminoácido pueden combinarse de forma que la CDR1 sea una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13, la CDR2 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 15, y la CDR3 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 17 u, la CDR1 es una región

que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 14, la CDR2 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 16, y la CDR3 es una región que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 18. Además, la CDR2 además puede incluir la secuencia de aminoácido de VKG en la terminal C de la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 16. Además, cualquier CDR puede consistir en estas secuencias de aminoácido.

[0048] Además, la secuencia de aminoácido de la región variable del péptido de afinidad con hTfR antes descrito puede ser una secuencia de aminoácido en la cual una mutación se añade siempre que el péptido pueda unirse de manera específica con la hTfR. En un caso en donde dicha mutación se aplica, la secuencia de aminoácido de la región variable del péptido de afinidad con hTfR después de aplicar la mutación tiene de preferencia 80% o más de identidad, con mayor preferencia 85% o más de identidad, con aún más preferencia 90% o más identidad, incluso con aún más preferencia 95% o más de identidad, y, por ejemplo, 98% o más de identidad con la secuencia de aminoácido original.

[0049] Además, en un caso en donde la mutación se aplica a la secuencia de aminoácido de la región variable, la mutación puede aplicarse a las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3, y la mutación puede aplicarse únicamente con la región FR. En un caso en donde dicha mutación se aplica, la secuencia de aminoácido de la región variable después de que se aplica la mutación de preferencia tiene 85% o más de identidad, con más preferencia 90% o más identidad, con aún más preferencia 95% o más de identidad, y, por ejemplo, 98% o más de

identidad con la secuencia de aminoácido original. Además, en un caso en donde la mutación se aplica a la secuencia de aminoácido de la región variable, la mutación puede aplicarse a las secuencias de aminoácido de la región FR, y la mutación puede aplicarse únicamente con la región FR.

5 En un caso en donde dicha mutación se aplica, la secuencia de aminoácido de la región variable después de que se aplica la mutación de preferencia tiene de preferencia 90% o más identidad, con más preferencia 95% o más de identidad, y, por ejemplo, 98% o más de identidad con la secuencia de aminoácido original. Además, la

10 mutación puede aplicarse con tanto la región FR como la región CDR.

[0050] La identidad entre la secuencia de aminoácido de la región variable original y la secuencia de aminoácido de la región variable a la cual se aplica la mutación puede calcularse con facilidad haciendo uso de un algoritmo de cálculo de homología conocido. Ejemplos de dicho

15 algoritmo incluyen BLAST (Altschul SF. J Mol. Biol. 215. 403-10, (1990)), un método de búsqueda de similitud de Pearson and Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85. 2444 (1988)), un algoritmo de homología local de Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2. 482-9 (1981)), entre otros. Además, en la totalidad de la presente memoria

20 descriptiva, la identidad se refiere a la identidad calculada por medio de estos algoritmos. En la presente memoria descriptiva, los términos “homología de secuencia de aminoácido” e “identidad de secuencia de aminoácido” se utilizan de manera intercambiable.

[0051] El caso en donde la mutación, como, por ejemplo, sustitución,

25 eliminación y adición se aplican a la secuencia de aminoácido de la región variable del péptido de afinidad con hTfR se describirá con mayor detalle

a continuación.

[0052] En un caso en donde los aminoácidos de la secuencia de aminoácido de la región variable del péptido de afinidad con hTfR se sustituyen con otros aminoácidos, el número de los aminoácidos que van a ser sustituidos de preferencia es 1 a 20, con mayor preferencia 1 a 15, con aún mayor preferencia 1 a 10, e incluso con aún mayor preferencia 1 a 5, y por ejemplo, 1, 2 o 3. En un caso en donde los aminoácidos en la secuencia de aminoácido de la región variable se eliminan, el número de los aminoácidos que van a ser eliminados de preferencia es 1 a 20, con mayor preferencia 1 a 15, con aún mayor preferencia 1 a 10, e incluso con aún mayor preferencia 1 a 5, y por ejemplo, 1, 2 o 3. Además, también pueden aplicarse las mutaciones en las cuales se combina la sustitución y la eliminación de estos aminoácidos. En un caso en donde un aminoácido se añade a la región variable, de preferencia 1 a 20, con mayor preferencia 1 a 15, con aún mayor preferencia 1 a 10, e incluso con aún mayor preferencia 1 a 5 de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2 o 3 aminoácidos se añaden a la secuencia de aminoácido o a la terminal N o la terminal C de la secuencia de aminoácido de la región variable. También pueden aplicarse las mutaciones en las cuales se combina la sustitución y la eliminación de estos aminoácidos.

[0053] En un caso en donde la mutación, como, por ejemplo, la sustitución, eliminación y adición se aplica a la secuencia de aminoácido de la región variable del péptido de afinidad con hTfR, la mutación puede solo aplicarse a la región FR sin aplicar la mutación a la secuencia de aminoácido de la región CDR (CDR1, CDR2 y CDR3). El número de los aminoácidos que van a sustituirse en un caso en donde la sustitución

se añade únicamente a la región FR de preferencia es 1 a 12, con mayor preferencia 1 a 10, con aún mayor preferencia 1 a 8, e incluso con aún mayor preferencia 1 a 4, y por ejemplo, 1, 2 o 3. Además, en un caso en donde el aminoácido se elimina únicamente en la secuencia de aminoácido de la región FR, el número de los aminoácidos que van a ser eliminados de preferencia es 1 a 8, con mayor preferencia 1 a 4, con aún mayor preferencia 1 a 3, e incluso con aún mayor preferencia 1 a 2, y por ejemplo, 1 o 2. Además, también pueden aplicarse las mutaciones en las cuales se combina la sustitución y la eliminación de estos aminoácidos. Además, en un caso en donde un aminoácido se añade solo en la secuencia de aminoácido de la región FR, de preferencia 1 a 8, con mayor preferencia 1 a 4, con aún mayor preferencia 1 a 3, e incluso con aún mayor preferencia 1 a 2 de aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos se añaden a la secuencia de aminoácido o la región variable de la terminal N o de la terminal C. También pueden aplicarse las mutaciones en las cuales se combina la sustitución y la eliminación de estos aminoácidos.

[0054] En un caso en donde la mutación se aplica solo a la región FR, se conoce un método para sustituir un residuo de aminoácido de la región FR del péptido de afinidad con hTfR con un residuo de aminoácido correspondiente de la región FR en la región variable del anticuerpo humano del tipo IgG. En la presente memoria descriptiva, este método es referido como humanización del péptido de afinidad con hTfR. Dicho método se divulga, por ejemplo, en Vincle C., et. Al., J biol Chem. 284. 3273-84 (2009). En un caso en donde el anticuerpo original es un anticuerpo de una alpaca, el anticuerpo puede reconocerse como un

antígeno en un caso en donde se administra a un humano. Se espera que el anticuerpo humanizado tenga una antigenicidad más baja que el anticuerpo original. En un caso en donde la mutación se aplica solo a la región FR, la humanización es una de las modalidades preferidas. En la presente memoria descriptiva, el péptido de afinidad con hTfR también incluye un péptido de afinidad con hTfR humanizado. El péptido de afinidad con hTfR humanizado también incluye el VHH humanizado, en un caso en donde el péptido de afinidad con hTfR es VHH.

[0055] En un caso en donde la mutación, como, por ejemplo, la sustitución, eliminación y adición se aplica a la secuencia de aminoácido de la región variable del péptido de afinidad con hTfR, la mutación puede solo aplicarse a la región CDR sin aplicar la mutación a la secuencia de aminoácido de la región FR. El número de los aminoácidos que van a sustituirse en un caso en donde la sustitución se aplica únicamente a la región CDR de preferencia es 1 a 4, con mayor preferencia 1 a 3, Y con aún mayor preferencia 1 o 2, y por ejemplo, 1 o 2. Además, en un caso en donde el aminoácido se elimina únicamente en la secuencia de aminoácido de la región CDR, el número de los aminoácidos que van a ser eliminados es 1 a 4, con mayor preferencia 1 a 3, y con aún mayor preferencia 1 o 2, y por ejemplo, 1 o 2. Además, también pueden aplicarse las mutaciones en las cuales se combina la sustitución y la eliminación de estos aminoácidos. Además, en un caso en donde el aminoácido se añade solo a la secuencia de aminoácido de la región FR, de preferencia 1 a 4, con mayor preferencia 1 a 3, y con aún mayor preferencia 1 a 2 aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 aminoácidos se añadieron a la secuencia de aminoácido o a la Terminal N o la terminal C

de la región variable. También pueden aplicarse las mutaciones en las cuales se combina la sustitución y la eliminación de estos aminoácidos.

[0056] En un caso en donde la mutación, como, por ejemplo, la sustitución, eliminación y adición, se aplica a la secuencia de aminoácido de la región variable del péptido de afinidad con hTfR, la mutación antes descrita en la cual la mutación en la región FR y la mutación en la región CDR se combinan, también se puede aplicarse a la secuencia de aminoácido.

[0057] La sustitución antes descrita de un aminoácido en la secuencia de aminoácido de la región variable con otro aminoácido ocurre, por ejemplo, dentro de una familia de aminoácido relacionada con la cadena lateral y las propiedades del aminoácido. Se predice que dicha sustitución dentro de la familia de aminoácido no ocasiona un cambio considerable en la función del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR (esto es, es una sustitución de aminoácido conservativa). Los ejemplos de dicha familia de aminoácido incluyen:

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

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

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

(4) serina y treonina, las cuales son aminoácidos que tienen un grupo hidroxilo (aminoácido hidroxilado),

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

(7) glicina y prolina, las cuales son aminoácidos que afectan la alineación de la cadena peptídica,

(8) asparagina y glutamina, las cuales son aminoácidos del tipo amida (aminoácidos polares),

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

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

10 (11) alanina y glicina, las cuales son aminoácidos que tiene la cadena lateral pequeña más particular,

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

[0058] La sustitución de aminoácido conservativo antes descrita también se aplica a un caso en donde un aminoácido en una secuencia de aminoácido de otra proteína, como, por ejemplo, seroalbúmina huma
15 (HSA) se sustituye con otro aminoácido.

[0059] En un caso en donde un aminoácido se añade a la terminal C o la terminal N al aplicar una mutación a la región variable, y el aminoácido añadido se ubica entre el péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente cuando el péptido de afinidad con hTfR se fusiona con la
20 proteína (A) diferente, el aminoácido añadido se define como una parte del péptido de afinidad con hTfR. En la proteína de fusión del péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A), un ligador ubicado entre el péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) se describirán en detalle
25 posteriormente. En la presente memoria descriptiva, el término “proteína (A) diferente” se refiere a una proteína que debe administrarse

a un humano en una forma unida con el péptido de afinidad con hTfR y la cual debe mostrar actividad fisiológica en el cuerpo del humano, y se refiere a una proteína diferente del péptido de afinidad con hTfR.

[0060] El péptido de afinidad con hTfR seleccionado mediante la etapa antes descrita o similares tiene cierta afinidad por hTfR. La región variable del péptido de afinidad con hTfR puede modificarse al introducir una mutación, como, por ejemplo, sustitución, eliminación o adición en la secuencia de aminoácido del mismo, de forma que la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR tenga las características deseadas. La introducción de la mutación en la secuencia de aminoácido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR se lleva a cabo al aplicar una mutación a un gen que corresponde a la secuencia de aminoácido.

[0061] La afinidad de la región variable del péptido de afinidad con hTfR por hTfR puede ajustarse de manera adecuada al aplicar una mutación, como, por ejemplo, sustitución, eliminación o adición con la secuencia de aminoácido que constituye la región variable del péptido de afinidad con hTfR. Por ejemplo, en un caso en donde la afinidad entre el péptido de afinidad con hTfR y el antígeno es alto y la constante de disociación en una solución acuosa es sorprendentemente baja, cuando el péptido de afinidad con hTfR se administra al cuerpo vivo, la región variable no puede disociarse del antígeno, y como un resultado, existe una posibilidad de que pueda ocurrir una inconveniencia funcional. En un caso como el anterior, al introducir una mutación en la región variable, la constante de disociación puede ajustarse paso por paso para ser 2 a 5 veces, 5 a 10 veces, 10 a 100 veces, o similar de la región variable

original, y se puede obtener el péptido de afinidad con hTfR preferido cumple con el propósito. Por otro lado, al introducir la mutación, la constante de disociación también puede ajustarse paso por paso a 1/2 a 1/5 veces, 1/5 a 1/10 veces, 1/10 a 1/100 veces, o similar de la región variable original.

[0062] La afinidad de unión entre el péptido de afinidad con hTfR y el receptor de transferrina, que es, la constante de disociación puede medirse por medio de un método, por ejemplo, haciendo uso de un método de interferometría de biocapa (BLI), específicamente, un sistema Octet. La totalidad o una parte de los receptores de transferrina derivados de un animal adecuado se fija a un sensor, y una solución que incluye una región variable del péptido de afinidad con hTfR se utiliza como una muestra para medir una constante de tasa de unión (K_{on}) o una constante de tasa de asociación (K_{off}), con lo cual una constante de disociación puede calcularse a partir del resultado. Además, de igual forma, la constante de disociación también puede calcularse por medio de un método haciendo uso de una técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR), específicamente, un método que hace uso de Biacore. Por ejemplo, el método de medición descrito en el Ejemplo 7 puede utilizarse de manera adecuada como un método que mide la afinidad de unión entre el péptido de afinidad con hTfR y el receptor de transferrina.

[0063] La introducción de la mutación, como, por ejemplo, sustitución, eliminación y adición a la secuencia de aminoácido de la región variable del péptido de afinidad con hTfR puede llevarse a cabo, por ejemplo, al hacer uso de un gen que codifica la región variable de un anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR como una plantilla y la introducción de una

mutación en un sitio específico de la secuencia de nucleótido del gen por medio de un método, como, por ejemplo, PCR, o al introducir una mutación aleatoria.

[0064] La introducción de una mutación en la secuencia de aminoácido del péptido de afinidad con hTfR con el fin de ajustar la afinidad entre el péptido de afinidad con hTfR y hTfR puede llevarse a cabo, por ejemplo, al incorporar un gen que codifique el péptido de afinidad con hTfR en un fagémido, producir un fago que exprese el péptido de afinidad con hTfR en la superficie de cápside que use el fagémido, y un activar un mutágeno o parecidos en el fago. El fago puede proliferarse mientras se introduce una mutación a un gen que codifica el péptido de afinidad con hTfR por medio de un mutágeno, y un fago que expresa un anticuerpo de una cadena sencilla que tiene una constante de disociación deseada puede seleccionarse a partir del fago proliferado por medio del método antes descrito.

[0065] En el péptido de afinidad con hTfR que tiene una afinidad relativamente alta por hTfR, la cual se obtiene por medio del método antes descrito, una constante de disociación (K_D) con hTfR, la cual de preferencia se mide por medio del método descrito en el Ejemplo 7, de preferencia es 5×10^{-8} M o menos, y con mayor preferencia 2×10^{-8} M o menos, y, por ejemplo, 1×10^{-8} M o menos, 5×10^{-9} M o menos y 1×10^{-9} o menos. Ejemplos del péptido adecuado incluyen un péptido en el cual una constante de disociación es 5×10^{-11} M a 1×10^{-8} M, 2×10^{-11} M a 1×10^{-8} , 1×10^{-10} M a 1×10^{-8} M, o 1.0×10^{-9} M a 1.0×10^{-8} M.

[0066] Al seleccionar el péptido de afinidad con hTfR que tiene una afinidad por el TfR de mono del péptido de afinidad con hTfR obtenido

tal y como se describió anteriormente, es posible obtener el péptido de afinidad con hTfR que tiene una afinidad por el TfR y el TfR de mono. El péptido de afinidad con hTfR que tiene una afinidad para el TfR de mono puede seleccionarse, por ejemplo, por medio de un método ELISA haciendo uso de un TfR de mono recombinante producido por medio de una técnica de recombinación genética. En este método ELISA, el TfR de mono recombinante se inmoviliza sobre una placa, el péptido de afinidad con hTfR se pone en contacto con la placa, el péptido de afinidad con hTfR no unido al TfR de mono recombinante se retira de la placa, y se mide la cantidad del péptido de afinidad con hTfR retenido sobre la placa. Entre más alta sea la afinidad del TfR de mono recombinante, más grande será la cantidad del péptido de afinidad con hTfR retenido sobre la placa, de forma que el péptido de afinidad con hTfR que corresponde con la placa en la cual se retienen más péptidos de afinidad con hTfR pueda seleccionarse como el péptido de afinidad con hTfR que tiene una afinidad por el TfR de mono. El término “mono” utilizado en la presente de preferencia se refiere a un mono diferente de un humano, con mayor preferencia a un mono clasificado como Cercopithecidae, con aún mayor preferencia se refiere a un mono clasificado como Macaca, y con aún mayor preferencia se refiere a un mono clasificado como Macaca, por ejemplo, un mono rhesus o un mono cangrejo, y en particular se refiere a un mono cangrejo. El uso del mono cangrejo es conveniente para la evaluación de la efectividad del fármaco aplicado haciendo uso del péptido de afinidad con hTfR. De igual forma, es posible obtener un péptido que tiene una afinidad por TfR tanto de humanos como de monos, por medio del mismo método para el péptido de región variable

del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR.

[0067] El péptido de afinidad con hTfR que tiene una afinidad por hTfR de humanos y monos tiene un efecto ventajoso ya que la farmacocinética en el cuerpo humano, en caso de ser administrado, puede observarse en un mono. Por ejemplo, en un caso en donde un elemento farmacéutico se desarrolla al hacer uso del péptido de afinidad con hTfR de acuerdo con la modalidad de la presente invención, al conducir una parte de pruebas no clínicas, como, por ejemplo, una prueba farmacocinética del elemento farmacéutico haciendo uso de monos, es posible predecir de manera más precisa la farmacocinética, entre otros, en un caso en donde el péptido se administra a un humano. Como resultado, el desarrollo del elemento farmacéutico puede promoverse considerablemente. Lo mismo puede aplicarse al péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR.

[0068] En la presente invención, el péptido de afinidad con hTfR que tiene una afinidad relativamente alta por hTfR y que tiene una afinidad por el TfR de un mono particularmente es de la siguiente manera en un caso en donde se mide con el método descrito en el Ejemplo 7.

(a) todas las constantes de disociación con hTfR y el TfR de mono son 5×10^{-11} M a 5×10^{-7} M, y

(b) todas las constantes de disociación con hTfR y el TfR de mono son 5×10^{-11} M a 1×10^{-8} M,

(a) todas las constantes de disociación con hTfR y el TfR de mono son 5×10^{-10} M a 1×10^{-8} M, y

(d) todas las constantes de disociación con hTfR y el TfR de mono son 1×10^{-10} M a 5×10^{-7} M, y

En particular, en (a) a (d), la proporción de la constante de disociación con el hTfR a la constante de disociación con TfR de mono de preferencia es 1 a 10, por ejemplo, 3 a 10, 5 a 10, o 3 a 5 en un caso en donde el valor de la constante de disociación con hTfR se establece en 1.

[0069] Ya que las constantes de disociación de los péptidos de afinidad con hTfR 1 a 3 en la presente modalidad con el TfR del ser humano y el mono son cualquiera de (a) a (e) antes descritos, puede decirse que el comportamiento en el cuerpo del mono en caso de ser administrado al mono se aproxima al comportamiento en caso de ser administrado al ser humano. Por lo tanto, en un fármaco aplicado con los péptidos de afinidad con hTfR 1 a 3, en una prueba utiliza monos, se obtiene un resultado que refleja el comportamiento en caso de ser administrado a un ser humano. Por lo tanto, como resultado de la prueba con monos, los resultados más útiles pueden obtenerse como un juicio material en caso de conducir un ensayo clínico con humanos. En particular, ya que la proporción de la constante de disociación con HTfR a la constante de disociación con TfR de mono se encuentra en un rango de 1 a 10, en un caso en donde el valor de la constante de disociación con hTfR es 1, los péptidos de afinidad con hTfR 1 y 2 son adecuados para suponer con facilidad del comportamiento en el cuerpo humano del comportamiento en el cuerpo de mono.

[0070] En un caso en donde el péptido de afinidad con hTfR en la modalidad de la presente invención se administra a un cuerpo vivo mediante una inyección intravenosa, entre otras, el péptido de afinidad con hTfR puede unirse de manera eficiente al hTfR presente en las células

endoteliales de capilares en el cerebro. El péptido de afinidad con hTfR unido al hTfR es capturado en el cerebro por medio de un mecanismo, como, por ejemplo, endocitosis, exocitosis y transcitosis, a través de la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, mediante la unión de una

5 proteína, un compuesto de bajo peso molecular, entre otros, con estos péptidos de afinidad con hTfR, estas sustancias pueden pasarse de manera eficiente a través de la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. Además, el péptido de afinidad con hTfR en la modalidad de la presente invención pasa a través de la barrera hematoencefálica y posteriormente

10 llega al parénquima cerebral del cerebro, las células de tipo neuronales del hipocampo, el parénquima cerebeloso, o al menos uno de los anteriores. Por lo tanto, al unir un fármaco que debe activarse en estos tejidos o células, específicamente, una proteína, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico, entre otros, con el péptido de afinidad

15 con hTfR de la presente invención, se puede hacer que el fármaco llegue a dichos tejidos o células. Dicho complejo del péptido de afinidad con hTfR y el fármaco es referido como un complejo de péptido de afinidad con hTfR-fármaco en la presente memoria descriptiva. Lo mismo puede decirse con respecto al péptido de región variable del anticuerpo

20 de cadena pesada de anti-hTfR y el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina del hTfR (incluyendo VHH). En lo sucesivo, el péptido de afinidad con hTfR se describirá en detalle, pero las aplicaciones, y otros, también se aplican al péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR, el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina de hTfR, el hTfR-VHH, entre otros.

25 [0071] Con el fin de permitir a una sustancia (proteína, compuesto de

bajo peso molecular, ácido nucleico, entre otros), la cual, en general, no es posible pasar a través de la barrera hematoencefálica, y, en consecuencia, apenas puede, o no puede en absoluto, ejercer una acción fisiológica o farmacológica en el cerebro en caso de una administración intravenosa, para ejercer una acción en el cerebro, puede ser un medio efectivo para formar un complejo con el péptido de afinidad con hTfR de acuerdo con la modalidad de la presente invención. En particular, el péptido de afinidad con hTfR de la presente invención pasa a través de la barrera hematoencefálica y posteriormente llega a la corteza del cerebro, las células de tipo neuronales del hipocampo, la corteza del cerebelo, o al menos uno de los anteriores. Por lo tanto, por medio de la administración intravenosa o administración a la sangre estas sustancias en una forma de unirse al péptido de afinidad con hTfR de la presente invención, es posible permitir a estas sustancias pasar a través de la barrera hematoencefálica y llegar al tejido nervioso central, y para ejercer o mejorar la actividad fisiológica del mismo en el tejido o la célula del sistema nervioso central. Lo mismo puede aplicarse al péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR.

[0072] Como un método para unir el péptido de afinidad con hTfR a dicha sustancia (proteína, compuesto de bajo peso molecular, ácido nucleico, entre otros), existe un método para unir el péptido de afinidad con hTfR a través de un ligador no peptídico o un ligador peptídico. Lo mismo puede aplicarse al péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR. Como el ligador no peptídico, puede utilizarse polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, un poliol polioxietilinado, alcohol

polivinílico, polisacáridos, dextrana, éter de polivinilo, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitinas, ácido hialurónico, o un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos. El ligador peptídico es una cadena peptídica o un derivado de la misma, el cual está compuesto a partir de 1 a 60 aminoácidos unidos por un enlace peptídico, y en el cual la terminal N y la terminal N de los mismos forman un enlace covalente con cualquiera de un péptido de afinidad con hTfR o proteína, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico, entre otros, de forma que el anticuerpo anti-hTfR y una proteína, un compuesto de bajo peso molecular, un ácido nucleico, o parecidos se unen entre sí.

[0073] Un ligador no peptídico en el cual el péptido de afinidad con hTfR de la presente invención y una proteína (A) diferente deseada se unen entre sí al usar PEG en particular es referido como una proteína (A) un péptido de afinidad con hTfR-PEG-proteína. El péptido de afinidad con hTfR-PEG-proteína puede producirse al producir un péptido de afinidad con hTfR-PEG al unir un péptido de afinidad con hTfR y PEG, y posteriormente unir el péptido de afinidad con hTfR-PEG y la proteína (A) diferente. De manera alternativa, el péptido de afinidad con hTfR-PEG-proteína también puede producirse mediante una proteína-PEG creada al unir la proteína (A) diferente y PEG entre sí, y posteriormente unir la proteína-PEG y el péptido de afinidad con hTfR entre sí. En un caso en donde PEG se une al péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente, se utiliza el PEG modificado con un grupo funcional, como, por ejemplo, carbonato, un carbonilimidazol, un éster activo de un ácido carboxílico, un azlactón, un imidotio cíclico, un isocianato, un isotiocianato, un imidato o un aldehído. El grupo funcional introducido

en estos PEG se hace reaccionar principalmente con el grupo amino en el péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente en la molécula, con lo cual el PEG y el péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente se enlazan de manera covalente entre sí. Un peso molecular y una forma del PEG utilizados en este punto no se limitan particularmente, y un peso molecular promedio (MW) del mismo de preferencia es 500 a 60,000, y con mayor preferencia 500 a 20,000. Por ejemplo, el PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 300, aproximadamente 500, aproximadamente 1,000, aproximadamente 2,000, aproximadamente 4,000, aproximadamente 10,000, aproximadamente 20,000, entre otros, pueden utilizarse de manera adecuada como el ligador no peptídico. Lo mismo aplica en un caso donde el péptido de afinidad con hTfR se une a un compuesto de bajo peso molecular, ácido nucleico, entre otros.

[0074] Por ejemplo, el péptido de afinidad con hTfR-PEG se obtiene al mezclar el péptido de afinidad con hTfR y un polietilenglicol (ALD-PEG-ALD) que tiene un grupo aldehído como un grupo funcional, de forma que la relación molar de ALD-PEG-ALD con el anticuerpo sea 1:11, 1:12.5, 1:15, 1:110, 1:120, entre otros, y añadir un agente reductor, como, por ejemplo, NaCNBH_3 a la mezcla para crear una reacción. Después, el péptido de afinidad con hTfR-PEG se hace reaccionar con la proteína (A) diferente en la presencia de un agente reductor, como, por ejemplo, NaCNBH_3 , para de ese modo obtener un péptido de afinidad con hTfR-PEG-proteína. Por otro lado, el péptido de afinidad con hTfR-PEG-proteína también puede obtenerse por medio de una primera unión con la proteína (A) diferente y el ALD-PEG-ALD para producir una proteína-

PEG, y posteriormente unirse con la proteína-PEG y el péptido de afinidad con hTfR.

[0075] El péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente también pueden unirse entre sí por medio de un ligador peptídico o directamente con la terminal C o la terminal N del péptido de afinidad con hTfR, respectivamente, por medio de un enlace peptídico. La proteína de fusión obtenida al unir dicho péptido de afinidad con hTfR y una proteína (A) diferente entre sí puede obtenerse como una proteína recombinante al incorporar un fragmento de ADN en el cual un ADNc que codifica la proteína (A) diferente se configura en estructura con una terminal 3' o terminal 5' de un ADNc que codifica el péptido de afinidad con hTfR con un fragmento de ADN que codifica una secuencia de aminoácido de un ligador peptídico interpuesto entre los mismos en un vector de expresión para una célula eucarionte, como, por ejemplo, una célula de mamífero o una levadura o un vector de expresión para una célula procarionte, como, por ejemplo, *Escherichia coli*, y posteriormente cultivar una célula huésped en la cual se ha introducido el vector de expresión. En la presente memoria descriptiva, la proteína recombinante, en la cual el péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente se unen entre sí, es referida como una proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR-proteína (A). De igual forma, la proteína recombinante, en la cual el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina se une con la proteína (A) diferente, es referido como una proteína de fusión de péptido de dominio variable único de inmunoglobulina-proteína (A). Además, una proteína recombinante, en la cual el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada

se une con una proteína (A) diferente, es referida como una proteína de fusión de péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada-proteína (A). La proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR-proteína (A), la proteína de fusión de péptido de dominio variable único de inmunoglobulina-proteína (A), y la proteína de fusión de péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada-proteína (A) pueden reemplazarse mutuamente dependiendo del contexto en la presente memoria descriptiva.

[0076] El ligador peptídico configurado entre el péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente de preferencia es una cadena peptídica que consiste en 1 a 60, o 1 a 50, con mayor preferencia 1 a 17, con aún mayor preferencia 1 a 10, y con aún mayor preferencia 1 a 5 aminoácidos, pero el número de aminoácidos que constituye el ligador peptídico puede ajustarse de manera adecuada a 1, 2, 3, 1 a 17, 1 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29, 27, o parecidos dependiendo de la proteína (A) diferente que va a unirse al anticuerpo anti-hTfR. Dicho ligador peptídico no se limita a una secuencia de aminoácido, siempre que el péptido de afinidad con hTfR enlazado a la misma tenga una afinidad por HTfR y la proteína (A) diferente enlazada mediante el ligador peptídico pueda mostrar una actividad fisiológica deseada bajo condiciones fisiológicas, pero de preferencia está compuesto a partir de glicina y serina.

[0077] Los ejemplos de un ligador peptídico preferido incluyen un ligador peptídico que consiste en un aminoácido (por ejemplo, glicina o serina), la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 19, la secuencia de aminoácido

establecida en la SEQ ID NO: 20, la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 21, la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 22, la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 23, la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 24, y la

5 secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 25. Además, los ejemplos del ligador peptídico preferido incluyen un ligador peptídico que consiste en un aminoácido (por ejemplo, glicina o serina), un ligador peptídico que incluye una secuencia, en la cual 2 a 10, o 2 a 5 secuencias de aminoácido se selecciona a partir del grupo que consiste en la

10 secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 19, la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 20, y la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 21 se configuran en serie. El ligador peptídico tiene una secuencia que consiste en 2 a 50 aminoácido,

15 una secuencia que consiste en 2 a 17 aminoácido, 2 a 10 aminoácido, 10 a 40 aminoácido, 20 a 34 aminoácido, 23 a 31 aminoácidos, 25 a 29 aminoácidos, o 27 aminoácidos. Por ejemplo, el ligador peptídico que incluye la secuencia de aminoácido Gly-Ser puede utilizarse de manera adecuada como el ligador peptídico. Además, el ligador peptídico que

20 incluye un total de 25 aminoácidos, en la cual la secuencia de aminoácido se establece en SEQ ID NO: 19 y se repite 5 veces, también puede utilizarse de manera adecuada como el ligador peptídico.

[0078] El péptido de afinidad con hTfR también puede unirse a una región Fc de IgG humano (región Fc hIgG). Al unir la región Fc hIgG

25 con el péptido de afinidad con hTfR, la estabilidad del péptido de afinidad con hTfR in vivo, por ejemplo, puede aumentarse la retención de sangre.

Los ejemplos de dicho péptido de afinidad con hTfR, al cual se une la región Fc hIgG, incluye un péptido, en el cual la región Fc hIgG se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de un ligador peptídico, y un péptido, en el cual la región Fc hIgG se une con la terminal N del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de un ligador peptídico. El conjugado de la región Fc y el péptido de afinidad con hTfR puede utilizarse para formar un complejo con una sustancia (proteína, compuesto de bajo peso molecular, ácido nucleico, entre otros), la cual normalmente no puede pasar a través de la barrera hematoencefálica, y, en consecuencia, no puede ejercer una acción fisiológica o farmacológica en el cerebro en caso de una administración intravenosa. Dicha sustancia puede unirse al conjugado de la región Fc y el péptido de afinidad con hTfR por medio del método antes descrito, por ejemplo, un método que utiliza PEG. Se predice que, en un caso en donde el complejo se administra a un cuerpo vivo por medio de una inyección intravenosa o parecidos, el complejo puede pasar a través de la barrera hematoencefálica y llega a la corteza del cerebro, las células de tipo neuronales del hipocampo, la corteza del cerebelo, entre otros. Por lo tanto, al utilizar el conjugado, es posible mostrar la actividad fisiológica de estas sustancias en el tejido o la célula del sistema nervioso central. Además, ya que la estabilidad en la sangre es mayor que la del complejo que no tiene una región Fc hIgG en la sangre, en un caso en donde se administra a un cuerpo vivo, el efecto farmacéutico puede mostrarse durante un periodo de tiempo más largo. Una proteína, en la cual el péptido de afinidad con hTfR se une con la región Fc de IgG humana, puede obtenerse como una proteína recombinante, de igual

forma con la proteína de fusión péptido de afinidad con hTfR-proteína (A).

[0079] El péptido de afinidad con hTfR y una proteína (A) diferente también pueden unirse con una región Fc hIgG. Al unir la región Fc hIgG, puede aumentarse la estabilidad del conjugado en el cuerpo vivo, por ejemplo, la retención de sangre. Los ejemplos de dicha proteína, a la cual la región Fc se une, incluye una proteína, en la cual la región Fc hIgG se une con la terminal C de la proteína (A) diferente de manera directa o a través de un ligador peptídico, y el péptido de afinidad con hTfR se une con la terminal C de la región Fc hIgG de manera directa o a través de un ligador peptídico. Además, dicha proteína incluye una proteína, en la cual la región Fc hIgG se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de ligador peptídico, y, además, la proteína (A) diferente se une con la terminal C de la región Fc hIgG de manera directa o a través de una secuencia de ligador. Además, dicha proteína incluye una proteína, en la cual la proteína (A) diferente se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de un ligador peptídico, y, además, la región Fc hIgG se une con la terminal C de la proteína (A) diferente de manera directa o a través de una secuencia de ligador. Además, dicha proteína incluye una proteína, en la cual el péptido de afinidad con hTfR se une con la terminal C de la proteína (A) diferente de manera directa o a través de un ligador peptídico, y, además, la región Fc hIgG se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de una secuencia de ligador. Además, dicha proteína incluye una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR se une con la terminal C de la región

Fc hIgG de manera directa o a través de un ligador peptídico, y, además, la proteína (A) diferente se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de una secuencia de ligador. Dicha proteína incluye una proteína, en la cual la proteína (A) diferente se une con la terminal C de la región Fc hIgG de manera directa o a través de un ligador peptídico, y el péptido de afinidad con hTfR se une con la terminal C de la proteína (A) diferente de manera directa o a través de una secuencia de ligador. La proteína, en la cual el péptido de afinidad con hTfR, la proteína (A) diferente y la región Fc hIgG se unen entre sí, puede obtenerse como una proteína recombinante, de igual forma con la proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR-proteína (A). Por lo tanto, la proteína recombinante obtenida también se incluye en la proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR-proteína (A). Puede utilizarse aquí un ligador peptídico configurado entre el péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente antes mencionados.

[0080] El tipo de IgG de la región Fc hIgG que va a ser unido no se limita de manera particular, y puede ser cualquiera de IgG1 a IgG5. Además, la región Fc hIgG introducida puede ser la región Fc completa o una parte de la región Fc. Los ejemplos de una modalidad preferida de dicha región Fc hIgG incluye una región Fc hIgG que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 26, la cual es la región completa del Fc de IgG1 humana.

[0081] El péptido de afinidad con hTfR también puede unirse con la seroalbúmina humana (HSA). Al unir la HSA con el péptido de afinidad con hTfR, la estabilidad del péptido de afinidad con hTfR in vivo, por ejemplo, puede mejorarse la retención de sangre. Los ejemplos de dicho

péptido de afinidad con hTfR, al cual se une la HSA, incluye un péptido, en el cual la HSA se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de un ligador peptídico, y un péptido, en el cual la HSA se une con la terminal N del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de un ligador peptídico. El conjugado de la HSA y el péptido de afinidad con hTfR puede utilizarse para formar un complejo, en el cual el conjugado se une de manera adicional con una sustancia (proteína, compuesto de bajo peso molecular, ácido nucleico, entre otros), la cual normalmente no puede pasar a través de la barrera hematoencefálica, y, en consecuencia, no puede ejercer una acción fisiológica o farmacológica en el cerebro por medio de una administración intravenosa. Dicha sustancia puede unirse al conjugado de la HSA y el péptido de afinidad con hTfR por medio del método antes descrito, por ejemplo, un método que utiliza PEG. Se predice que, en un caso en donde el complejo se administra a un cuerpo vivo por medio de una inyección intravenosa o parecidos, el complejo puede pasar a través de la barrera hematoencefálica y llega a la corteza del cerebro, las células de tipo neuronales del hipocampo, la corteza del cerebelo, entre otros. Por lo tanto, al utilizar el conjugado, es posible mostrar la actividad fisiológica de estas sustancias en el tejido o la célula del sistema nervioso central. Además, ya que la estabilidad en la sangre del complejo es más alta que la estabilidad en la sangre del complejo que no tiene HSA, en un caso en donde se administra a un cuerpo vivo, la efectividad del fármaco puede mostrarse durante un periodo de tiempo largo. Una proteína, en la cual el péptido de afinidad con hTfR se une con la HSA, puede obtenerse como una proteína recombinante, de igual

forma con la proteína de fusión péptido de afinidad con hTfR-proteína (A).

[0082] La HSA también puede unirse de manera adicional con la proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR-proteína (A). Los

5 ejemplos de dicha proteína, a la cual la HSA se une, incluye una proteína, en la cual la HSA se une con la terminal C de la proteína (A) diferente de manera directa o a través de un ligador peptídico, y además el péptido de afinidad con hTfR se une con la terminal C de la HSA de manera directa o a través de un ligador peptídico. Además, dicha proteína incluye una

10 proteína, en la cual la HSA se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de ligador peptídico, y, además, la proteína (A) diferente se une con la terminal C de la HSA de manera directa o a través de una secuencia de ligador. Además, dicha proteína incluye una proteína, en la cual la proteína (A) diferente se une

15 con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de un ligador peptídico, y, además, la HSA se une con la terminal C de la proteína (A) diferente de manera directa o a través de una secuencia de ligador. Además, dicha proteína incluye una proteína, en la cual el péptido de afinidad con hTfR se une con la terminal C de la

20 proteína (A) diferente de manera directa o a través de un ligador peptídico, y, además, la HSA se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR de manera directa o a través de una secuencia de ligador. Además, dicha proteína incluye una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR se une con la terminal C de la HSA de

25 manera directa o a través de un ligador peptídico, y, además, la proteína (A) diferente se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR

de manera directa o a través de una secuencia de ligador. Además, dicha proteína incluye una proteína, en la cual la proteína (A) diferente se une con la terminal C de la HSA de manera directa o a través de un ligador peptídico, y, además, la HSA se une con la terminal C de la proteína (A) diferente de manera directa o a través de una secuencia de ligador. Una proteína obtenida al unir el péptido de dominio variable único de inmunoglobulina de hTfR con la proteína (A) diferente y la HSA puede obtenerse como una proteína recombinante, de igual forma con la proteína de fusión de péptido de dominio variable único de inmunoglobulina de hTfR-proteína (A). Por lo tanto, la proteína recombinante obtenida también se incluye en la proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR-proteína (A). Puede utilizarse aquí un ligador peptídico configurado entre el péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente antes mencionados.

[0083] La HSA antes descrita de preferencia es una HSA del tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácido que se muestra en SEQ ID NO: 27, pero no se limita a la misma, y siempre que la estabilidad de la sustancia unida con la HSA en la sangre pueda mejorarse, puede utilizarse una HSA mutante en la cual una sustitución, eliminación o adición se añade a la secuencia de aminoácido de la HSA del tipo silvestre.

[0084] Una sustancia que tiene una afinidad por albúmina también puede utilizarse en lugar de la HSA. Ya que una sustancia que tiene una afinidad por albúmina se une con la albúmina en la sangre, la vida media en la sangre de la proteína de fusión del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR y la proteína (A) diferente o parecidos administrados a un

cuerpo vivo puede aumentarse en la misma forma que en un caso en donde se hace uso de HSA. Puede utilizarse como la sustancia que tiene una afinidad por albúmina, por ejemplo, un péptido obtenido al modificar un dominio de unión de albúmina de una proteína derivada de cepa de Streptococcus G418 que tiene una secuencia de aminoácido representada por SED ID NO: 28 para mostrar una resistencia a álcalis (Alm T. biotechnol J. 5. 605-17 (2010)).

[0085] La afinidad de unión de la albúmina con la proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR-proteína (A) a la cual se ha introducido la afinidad de albúmina, la cual se mide en conformidad con el método de interferometría de biocapa descrita en el Ejemplo 7, de preferencia es 1×10^{-7} M o menos, con mayor preferencia 5×10^{-7} M o menos, con aún mayor preferencia 1×10^{-8} M o menos, e incluso con aún mayor preferencia 1×10^{-9} M o menos.

[0086] Una pluralidad de los péptidos de afinidad con hTfR también puede unirse directamente o a través de un ligador peptídico. En dicho caso, la pluralidad de los péptidos de afinidad con hTfR que van a unirse entre sí pueden tener la misma secuencia de aminoácido, o pueden tener diferentes secuencias de aminoácido. El número de los péptidos de afinidad con hTfR que van a unirse no se limita de manera particular, sino que es, por ejemplo, 2 a 10, 2 a 5, 2, 3, entre otros. Al unir la pluralidad de péptidos de afinidad con hTfR, es posible para impartir propiedades, como, por ejemplo, mejorar la afinidad por anti-hTfR. En la presente memoria descriptiva, un péptido en el cual una pluralidad de péptidos de afinidad con hTfR se enlazan en esta forma es referido como un péptido de afinidad con hTfR de tipo tándem. El péptido de afinidad con hTfR

de tipo tándem se incluye en el péptido de afinidad con hTfR. Lo mismo puede decirse del péptido de dominio variable único de inmunoglobulina y el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR.

- 5 [0087] El ligador peptídico utilizado para unir el péptido de afinidad con hTfR antes descrito con la región Fc hIgG o HSA de preferencia está compuesto a partir de 1 a 60, o 1 a 50 aminoácidos. Aquí, el número de aminoácidos se ajusta de manera apropiada de 1 a 17, 1 a 10, 10 a 40, 20 a 34, 23 a 31, 25 a 29, 27, entre otros. Dicho ligador peptídico no está
- 10 limitado, siempre que el péptido de afinidad con hTfR enlazado a la misma tenga una afinidad por HTfR y la región Fc hIgG o HSA enlazada mediante el ligador peptídico pueda mostrar una función deseada bajo condiciones fisiológicas, y de preferencia está compuesto a partir de glicina y serina. Lo mismo aplica al ligador peptídico utilizado para unir
- 15 el péptido de afinidad con hTfR, la proteína (A) diferente y la región Fc hIgG. Lo mismo aplica al ligador peptídico utilizado para unir el péptido de afinidad con hTfR, la proteína (A) diferente y la HSA. Lo mismo aplica al ligador peptídico para unir una pluralidad de péptidos de afinidad con hTfR.
- 20 [0088] Los ejemplos del ligador peptídico preferido incluyen un ligador peptídico que consiste en un aminoácido (por ejemplo, glicina o serina), la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 19, la secuencia de aminoácido establecida
- 25 en la SEQ ID NO: 20, la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 21, la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 22,

la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 23, la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 24, y la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 25. Además, los ejemplos del ligador peptídico preferido incluyen un ligador peptídico que consiste en un aminoácido (por ejemplo, glicina o serina), un ligador peptídico que incluye una secuencia, en la cual 2 a 10, o 2 a 5 secuencias de aminoácido se selecciona a partir del grupo que consiste en la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 19, la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 20, y la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 21 se configuran en serie. El ligador peptídico tiene una secuencia que consiste en 2 a 50 aminoácido, una secuencia que consiste en 2 a 17 aminoácido, 2 a 10 aminoácido, 10 a 40 aminoácido, 20 a 34 aminoácido, 23 a 31 aminoácidos, 25 a 29 aminoácidos, o 27 aminoácidos. Por ejemplo, el compuesto que incluye la secuencia de aminoácido Gly-Ser puede utilizarse de manera adecuada como el ligador peptídico. Además, el ligador peptídico que incluye un total de 25 aminoácidos, en la cual la secuencia de aminoácido se establece en SEQ ID NO: 19 y se repite 5 veces, también puede utilizarse de manera adecuada como el ligador peptídico.

[0089] El péptido de afinidad con hTfR y la proteína de fusión péptido de afinidad con hTfR-proteína (A) también puede estabilizarse en la sangre por medio de un método diferentes del mencionado al anterior. Por ejemplo, estas proteínas pueden modificarse con PEG para mejorar la estabilidad en la sangre. Por lo general, se ha llevado a la práctica dicho método en el campo de medicina proteínica, y eritropoyetina

PEGilada, interferón, entre otros, para uso farmacéutico. Además, el péptido de afinidad con hTfR también puede estabilizarse al introducir una mutación en el péptido de afinidad con hTfR.

[0090] La proteína (A) diferente que va a unirse con el péptido de afinidad con hTfR no está particularmente limitada, pero es una proteína que muestra actividad fisiológica in vivo, y, en particular, es una proteína de la cual no se espera que funcione en el cerebro por medio de una administración intravenosa, ya que no puede pasar a través de la barrera hematoencefálica tal y como son, aunque necesita llegar al cerebro y mostrar la función del mismo. Ejemplos de dicha proteína incluyen enzimas lisosomales, como, por ejemplo, iduronato-2-sulfatasa (IDS), glucocerebrosidasa (GBA), β -galactosidasa, proteína activadora de 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-sulfatasa, ceramidasa ácida (AC), amilo-1,6-glucosidasa, sialidasa, aspartilglucosaminidasa, tioesterasa de proteína palmitoilada-1 (PPT-1), tripeptidil peptidasa-1 (TPP-1), hialuronidasa-1, α -glucosidasa ácida (GAA), CLN1 y CLN2. Lo mismo puede aplicarse al péptido de región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR.

[0091] El péptido de afinidad con hTfR unido a α -L-iduronidasa

(IDUA) puede utilizarse como un agente terapéutico para el síndrome de Hurler o el síndrome de Hurler-Sheie, el péptido de afinidad con hTfR unido a iduronato-2-sulfatasa (IDS) puede utilizarse como un agente terapéutico para el síndrome de Hunter, El péptido de afinidad con hTfR unido a la glucocerebrosidasa (GBA) puede utilizarse como agente terapéutico para la enfermedad de Gaucher; el péptido de afinidad con hTfR unido a la β -galactosidasa puede utilizarse como agente terapéutico para la gangliosidosis GM1 tipos 1 a 3; el péptido de afinidad con hTfR unido a la proteína activadora de GM2 puede utilizarse como agente terapéutico para la gangliosidosis GM2 variante AB; el péptido de afinidad con hTfR unido a la β -hexosaminidasa A puede utilizarse como agente terapéutico para la enfermedad de Sandhoff y la enfermedad de Tay-Sachs; el péptido de afinidad con hTfR unido a la β -hexosaminidasa B puede utilizarse como agente terapéutico para la enfermedad de Sandhoff; el péptido de afinidad con hTfR unido a la N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa puede utilizarse como agente terapéutico para la enfermedad de células I; el péptido de afinidad con hTfR unido a la α -manosidasa (LAMAN) puede utilizarse como agente terapéutico para la α -manosidosis; el péptido de afinidad con hTfR unido a la β -manosidasa puede utilizarse como agente terapéutico para la β -manosidosis; el péptido de afinidad con hTfR unido a la galactosilceramidasa (GALC) puede utilizarse como agente terapéutico para la enfermedad de Krabbe; el péptido de afinidad con hTfR unido a la saposina C puede utilizarse como agente terapéutico para una enfermedad de acumulación tipo Gaucher; el péptido de afinidad con hTfR unido a la arilsulfatasa A (ARSA) puede utilizarse como agente

terapéutico para la leucodistrofia metacromática; el péptido de afinidad
 con hTfR unido a la α -L-fucosidasa (FUCA1) puede utilizarse como
 agente terapéutico para la fucosidosis; el péptido de afinidad con hTfR
 unido a la aspartilglucosaminidasa puede utilizarse como agente
 5 terapéutico para la aspartilglucosaminuria; el péptido de afinidad con
 hTfR unido a la α -N-acetilgalactosaminidasa puede utilizarse como
 agente terapéutico para la enfermedad de Schindler y la enfermedad de
 Kawasaki; el péptido de afinidad con hTfR unido a la esfingomielinasa
 ácida (ASM) puede utilizarse como agente terapéutico para la
 10 enfermedad de Niemann-Pick; el péptido de afinidad con hTfR unido a
 la α -galactosidasa A puede utilizarse como agente terapéutico para la
 enfermedad de Fabry; el péptido de afinidad con hTfR unido a la β -
 glucuronidasa (GUSB) puede utilizarse como agente terapéutico para el
 síndrome de Sly; el péptido de afinidad con hTfR unido a la heparán N-
 15 sulfatasa (SGSH) puede utilizarse como agente terapéutico para el
 síndrome de Sanfilippo tipo A; el péptido de afinidad con hTfR unido a
 la α -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU) puede utilizarse como agente
 terapéutico para el síndrome de Sanfilippo tipo B; el péptido de afinidad
 con hTfR unido a la acetil-CoA: α -glucosaminida N-acetiltransferasa y a
 20 la N-acetilglucosamina-6-sulfatasa puede utilizarse como agente
 terapéutico para el síndrome de Sanfilippo; el péptido de afinidad con
 hTfR unido a la ceramidasa ácida (AC) puede utilizarse como agente
 terapéutico para la enfermedad de Farber; el péptido de afinidad con hTfR
 unido a la amilo-1,6-glucosidasa puede utilizarse como agente
 25 terapéutico para la enfermedad de Cori (enfermedad de Forbes-Cori); el
 péptido de afinidad con hTfR unido a la sialidasa puede utilizarse como

agente terapéutico para trastornos del sistema nervioso central por
 deficiencia de sialidasa; el péptido de afinidad con hTfR unido a la
 tioesterasa de proteína palmitoilada-1 (PPT-1) puede utilizarse como
 agente terapéutico para la lipofuscinosis ceroida neuronal o enfermedad
 5 de Santavuori-Haltia; el péptido de afinidad con hTfR unido a la
 tripeptidil peptidasa-1 (TPP-1) puede utilizarse como agente terapéutico
 para la lipofuscinosis ceroida neuronal o enfermedad de Jansky-
 Bielschowsky; el péptido de afinidad con hTfR unido a la hialuronidasa-
 1 puede utilizarse como agente terapéutico para la deficiencia de
 10 hialuronidasa; el péptido de afinidad con hTfR unido a la α -glucosidasa
 ácida (GAA) puede utilizarse como agente terapéutico para la
 enfermedad de Pompe; y el péptido de afinidad con hTfR unido a CLN1
 y CLN2 puede utilizarse como agente terapéutico para cada una de las
 formas de la enfermedad de Batten. El péptido de afinidad con hTfR
 15 unido con la enzima puede utilizarse como un agente terapéutico para un
 trastorno nervioso central en la enfermedad lisosomal en particular. Por
 ejemplo, el péptido de afinidad con hTfR unido con α -L-iduronidasa
 (IDUA) puede utilizarse como un agente terapéutico para un trastorno del
 sistema nervioso central en el síndrome de Hurler o el síndrome de
 20 Hurler-Scheie. La aplicación médica no se limita a estas enfermedades.
 [0092] Los ejemplos de la proteína que puede mostrar una efectividad
 farmacológica al unirse con el péptido de afinidad con hTfR incluye un
 factor de crecimiento, un fármaco de anticuerpo, una citocina, un factor
 de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento nervioso derivado
 25 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 de células epiteliales (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 (M-CSF), receptor del factor de necrosis tumoral α (TNF- α R), ligando de PD-1, PD-L1, PD-L2, una enzima con actividad de degradación de β -amiloide, un anticuerpo anti- β -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.

[0093] El péptido de afinidad con hTfR que se une con un factor de crecimiento nervioso (NGF) puede utilizarse como agente terapéutico para un trastorno neurológico como la enfermedad de Alzheimer; el péptido de afinidad por hTfR unido a un factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) puede utilizarse como agente terapéutico para un trastorno neurológico como la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer; el péptido de afinidad por hTfR unido a CNTF puede utilizarse como agente terapéutico para la esclerosis lateral amiotrófica; el péptido de afinidad por hTfR unido a GDNF, neurotrofina 3 o neurotrofina 4/5 puede utilizarse como agente terapéutico para la isquemia cerebral; el péptido de afinidad por hTfR unido a GDNF puede utilizarse como agente terapéutico para la enfermedad de Parkinson; el péptido de afinidad por hTfR unido a la neuregulina 1 puede utilizarse

como agente terapéutico para la esquizofrenia; el péptido de afinidad por hTfR unido a eritropoyetina o darbepoetina puede utilizarse como agente terapéutico para la isquemia cerebral; el péptido de afinidad por hTfR unido a bFGF o FGF2 puede utilizarse como agente terapéutico para trastornos traumáticos del sistema nervioso central y para la recuperación después de una cirugía cerebral o una cirugía de columna; el péptido de afinidad por hTfR unido a una enzima con actividad de degradación de β -amiloide, a un anticuerpo anti- β -amiloide o a un anticuerpo anti-BACE puede utilizarse como agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer; el péptido de afinidad por 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 puede utilizarse como agente terapéutico para un tumor del sistema nervioso central, incluido un tumor cerebral; y el péptido de afinidad por hTfR unido a TNF α R puede utilizarse como agente terapéutico para la isquemia cerebral y enfermedades encefalíticas.

[0094] Un agente terapéutico para una enfermedad neurodegenerativa, como, por ejemplo, un enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington; un trastorno mental como la esquizofrenia y la depresión; un tumor del sistema nervioso central, incluida la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica y el tumor cerebral; una enfermedad lisosomal acompañada de trastorno cerebral; una enfermedad de almacenamiento de glucógeno; una distrofia muscular; isquemia cerebral; una enfermedad encefálica; una enfermedad priónica; un trastorno traumático del sistema nervioso central, entre otros, puede ser una proteína (A) diferente que va a fusionarse con el péptido

de afinidad con hTfR en general. Además, un agente terapéutico para una enfermedad del sistema nervioso central viral o bacteriana también puede ser una proteína (A) diferente que va a fusionarse con el péptido de afinidad con hTfR en general. Además, el fármaco que también puede utilizarse para la recuperación después de una neurocirugía o una cirugía de columna puede ser una proteína (A) diferente que va a fusionarse con el péptido de afinidad con hTfR en general.

[0095] En la presente invención, el agente terapéutico también incluye un agente terapéutico utilizado para prevenir el inicio de una enfermedad.

[0096] Las proteínas enumeradas anteriormente como la proteína (A) diferente que va a fusionarse con el péptido de afinidad con hTfR por lo regular son las proteínas del tipo silvestre. Sin embargo, una variante en la cual uno o más aminoácidos que constituyen estas proteínas del tipo silvestre se sustituyen con otros aminoácidos, eliminados, entre otros, también se incluye en dichas proteínas siempre que la variante tenga la actividad fisiológica original de la proteína. Aquí, “la proteína tiene la actividad fisiológica original” significa que la proteína tiene 20% o más actividad fisiológica con respecto a la actividad fisiológica de la proteína del tipo silvestre. La actividad fisiológica con respecto a la actividad fisiológica de la proteína del tipo silvestre es con mayor preferencia 40% o más, con aún mayor preferencia 50% o más, con aún mayor preferencia 80% o más, y con aún mayor preferencia 90% o más.

[0097] Una secuencia de aminoácido de la proteína variante tiene de preferencia 80% o más, con mayor preferencia 85% o más, con aún mayor preferencia 90% o más, e incluso con aún mayor preferencia 95% y, por ejemplo, 98% o más identidad con la secuencia de aminoácido de

la proteína (A) del tipo silvestre correspondiente.

[0098] En un caso en donde la secuencia de aminoácido de la proteína (A) diferente del tipo silvestre se sustituye con otro aminoácido para obtener una variante, el número de los aminoácidos que van a sustituirse de preferencia es 1 a 10, con mayor preferencia 1 a 5 y con aún mayor preferencia 1 a 3. En un caso en donde, el aminoácido se elimina, el número de aminoácidos que van a eliminarse de preferencia es 1 a 10, con mayor preferencia 1 a 5, y con aún mayor preferencia 1 a 3. Además, una variante deseada también puede obtenerse al combinar la sustitución y la eliminación. Además, una proteína en la cual uno o más aminoácidos se añade a la proteína (A) del tipo silvestre o una variante de la misma en la secuencia de aminoácido, la terminal N, o la terminal C también se incluye en estas proteínas, siempre que la proteína tenga la función de una proteína en su totalidad o de manera parcial. El número de aminoácidos que van a añadirse en este momento de preferencia es 1 a 10, con mayor preferencia 1 a 5, y con aún mayor preferencia 1 a 3. Una variante deseada también puede obtenerse al combinar la adición, sustitución y eliminación de estos aminoácidos.

[0099] Un caso en donde una mutación se aplica a la proteína (A) diferente y un aminoácido se añade a la terminal C o la terminal N, el aminoácido añadido se considera como siendo parte de la proteína (A) diferente en un caso donde el aminoácido añadido se posiciona entre la proteína (A) diferente y el péptido de afinidad con hTfR cuando la proteína (A) diferente se fusiona con el péptido de afinidad con hTfR.

[0100] Los ejemplos de una proteína de fusión adecuada en un caso donde la proteína (A) diferente es IDS humana incluye los siguientes (1)

a (4):

(1) una proteína de fusión en la cual la terminal N de hIDA se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR que consiste en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, a través del ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 25,

(2) una proteína de fusión en la cual la terminal N de hIDA se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR 2 que consiste en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5 a través del ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 25,

(3) una proteína de fusión en la cual la terminal N del péptido de afinidad con hTfR 2 que consiste en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5 se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR 2 que consiste en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5 a través del ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 25, y además con la terminal C de la misma, la terminal N de la hIDS se une a través del ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácido GS.

[0101] Los ejemplos de una proteína de fusión adecuada en un caso donde la proteína (A) diferente es SGSH humana incluye los siguientes. Esto es,

(1) una proteína de fusión en la cual la terminal N de hSGSH se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR que consiste en una secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, a través del ligador peptídico que tiene la secuencia

de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 25,

(2) una proteína de fusión en la cual la terminal N de hSGSH se une con la terminal C del péptido de afinidad con hTfR 2 que consiste en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 a través del
5 ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 25.

[0102] Trastuzumab es un fármaco de anticuerpo que muestra un efecto antitumoral al unir de manera específica con HER2 codificado por medio de un gen de cáncer humano HER2/neu (c-erbB-2). El trastuzumab
10 consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, y las secuencias de aminoácido de las mismas se muestran en SEQ ID NO: 29 y 30, respectivamente.

[0103] Los ejemplos específicos de la proteína de fusión del péptido de afinidad con hTfR y la proteína (A) diferente en la presente invención
15 incluye una proteína de fusión del péptido de afinidad con hTfR y el trastuzumab, en el cual el péptido de afinidad con hTfR 1 se une con la terminal C de la cadena pesada del trastuzumab a través del ligador. La proteína de fusión del péptido de afinidad con hTfR 1 y el trastuzumab puede producirse, por ejemplo, al cultivar una célula huésped en la cual
20 un vector de expresión de una proteína (proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 1-cadena pesada de trastuzumab) que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 31, en la cual el péptido de afinidad con hTfR 1 que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 4 se une con la terminal C de la cadena pesada de trastuzumab a través
25 del ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 24, y se ha introducido un vector de expresión de una proteína de

una cadena ligera de trastuzumab. Al utilizar un vector de expresión de la proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 2-cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 32 o un vector de expresión de la proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 3-cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 33, en lugar del vector de expresión de la proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 1-cadena pesada de trastuzumab, también es posible para producir una proteína de fusión de otra modalidad del péptido de afinidad con hTfR y el trastuzumab.

[0104] El trastuzumab se utiliza principalmente como un agente terapéutico para cáncer de mama, pero en caso de una inyección intravenosa no puede pasar a través de la BHE, y, en consecuencia, no puede mostrar una efectividad farmacológica en el cáncer del sistema nervioso central. Sin embargo, al unir el trastuzumab con el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR, el trastuzumab puede pasar a través de la BHE, y, en consecuencia, puede actuar en el cáncer que expresa HER2 en el sistema nervioso central. Ya que el cáncer de mama puede iniciar metástasis en el sistema nervioso central, la proteína de fusión del péptido de afinidad con TfR y el trastuzumab puede esperarse que sea efectiva en contra del cáncer del sistema nervioso central en metástasis de dicho cáncer de mama.

[0105] El fármaco de anticuerpo diferente de trastuzumab también puede producirse como una proteína de fusión con el péptido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR en la misma forma que el trastuzumab. En este caso, el péptido de la región variable del

anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR puede unirse con la terminal C de la cadena pesada del anticuerpo, el cual es el ingrediente activo del fármaco de anticuerpo, puede unirse con la terminal N de la cadena pesada del anticuerpo, puede unirse con la terminal C de la cadena ligera del anticuerpo, o puede unirse con la terminal N de la cadena ligera del anticuerpo.

[0106] El fármaco que va a formar un complejo con el péptido de afinidad con hTfR puede ser un compuesto de bajo peso molecular. Aquí, el compuesto de bajo peso molecular de preferencia es un compuesto de bajo peso molecular, el cual debe pasar a través de la BHE y actuar en el sistema nervioso central, pero no se limita a la misma, y puede ser un agente de contraste, un colorante fluorescente, un fosfolípido, el cual puede ser un constituyente de liposomas, un lípido funcional, el cual puede ser un constituyente de nanopartículas lípidos, entre otros. El peso molecular del compuesto de bajo peso molecular es, por ejemplo, 1 a 50 kD, 0.5 a 20 kD o 1 a 5 kD. Un péptido que consiste en 5 a 20 aminoácido y un polisacárido que tiene una estructura en la cual 5 a 20 monosacáridos se condensan al deshidratarlos y también se incluyen en el compuesto de bajo peso molecular.

[0107] El péptido de afinidad con hTfR y el compuesto de bajo peso molecular se unen entre sí por medio de un enlace covalente de manera directa o a través de un ligador. Un modo de unión del péptido de afinidad con hTfR y el compuesto de bajo peso molecular no se limita de manera particular, siempre que la afinidad de unión del péptido de afinidad con hTfR con el hTfR se mantenga y el fármaco muestra una efectividad farmacológica en el sistema nervioso central en un caso donde

el complejo péptido de afinidad con hTfR-fármaco se administra a un cuerpo vivo. Se utiliza adecuadamente como el ligador, por ejemplo, un ligador que contiene valina-citrullina o valina-alanina, el cual es cortado por una catepsina B, o un ligador que contiene cisteína-cisteína. En caso de administrarse a un cuerpo vivo, dicho ligador puede ser cortado por un mecanismo metabólico, por ejemplo, una enzima, en el cuerpo vivo de forma que el compuesto de bajo peso molecular pueda separarse a partir del péptido de afinidad con hTfR y pueda mostrar solo una efectividad del fármaco. En la presente memoria descriptiva, dicho ligador que puede ser cortado en el cuerpo vivo es referido como un ligador biodegradable.

[0108] En un caso donde el péptido de afinidad con hTfR y el compuesto de bajo peso molecular se unen entre sí por medio del ligador biodegradable, es posible colocar un espaciador además del ligador entre estos. Al colocar el espaciador, la enzima que rompe el ligador mejora su accesibilidad al complejo. Dicho espaciador no se limita particularmente, pero se utiliza un grupo p-aminocarbamato/grupo carbamato.

[0109] El fármaco en el complejo de péptido de afinidad con hTfR-fármaco puede ser un ácido nucleico. Aquí, el ácido nucleico puede ser cualquiera de los siguientes: DNA monocatenario, ADN bicatenario, ARN monocatenario o ARN bicatenario. Con el fin de prevenir que el ácido nucleico se degrade por medio de una nucleasa en un cuerpo vivo, el nucleótido que constituye estos ácidos nucleicos puede modificarse para ser un ácido nucleico resistente a la nucleasa. La longitud de cadena del ácido nucleico no se limita particularmente, sino que es, por

ejemplo, 10 bp a 1,000 bp, o 10 bp a 100 bp. En el complejo, el péptido de afinidad con hTfR y el ácido nucleico se unen entre sí por medio de un enlace covalente de manera directa o a través de un ligador. Un modo de unión del dominio variable único de inmunoglobulina y el compuesto de bajo peso molecular no se limita de manera particular, siempre que la afinidad de unión del péptido de afinidad con hTfR con el hTfR se mantenga y el fármaco muestra una efectividad farmacológica en el sistema nervioso central en un caso donde el complejo péptido de afinidad con hTfR-ácido nucleico se administra a un cuerpo vivo. Como el ligador, es preferible utilizar un ligador biodegradable.

[0110] En un caso donde el péptido de afinidad con hTfR y el ácido nucleico se unen entre sí por medio de un ligador biodegradable, es posible colocar un espaciador además del ligador entre estos. Al colocar el espaciador, se mejora la accesibilidad al complejo de ácido nucleico que va a ser roto por el ligador. Dicho espaciador no se limita particularmente, pero se utiliza un grupo p-aminocarbamato/grupo carbamato.

[0111] El ácido nucleico que va a unirse con el péptido de afinidad con hTfR es, por ejemplo, un ácido nucleico utilizado para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso central. Dicho ácido nucleico es un ácido nucleico antisentido del ARNm, la expresión de la cual se mejora de manera anormal en el sistema nervioso central. Dicho ácido nucleico antisentido muestra un efecto de unión con el ARNm expresado para inhibir la traducción del ARNm en una proteína.

[0112] El complejo de péptido de afinidad con hTfR-fármaco (incluyendo la proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR-

proteína (A) diferente) puede suministrarse a una institución médica en la forma de un producto liofilizado, un agente líquido acuoso, entre otros, como un fármaco (composición farmacéutica) que contiene el complejo de péptido de afinidad con hTfR-fármaco como un ingrediente activo.

5 En un caso de agente líquido, el complejo de péptido de afinidad con hTfR-fármaco puede suministrarse como una formulación en la cual el complejo de péptido de afinidad con hTfR-fármaco se disuelve con antelación en una solución que contiene un estabilizador, un amortiguador, un agente isotonizante, entre otros, y se encierra en un
10 frasco o una jeringa. El agente encerrado en la jeringa por lo general es referido como un agente de jeringa previamente llenada. Al utilizar el agente de jeringa previamente llenada, es posible simplificar la administración del fármaco por el mismo paciente. La administración del fármaco se lleva a cabo a través de un método no oral, por ejemplo,
15 una inyección intravenosa. El fármaco administrado puede pasar a través de la barrera hematoencefálica y muestra una efectividad farmacológica en el sistema nervioso central, y puede mostrar una efectividad farmacológica en la corteza cerebral, el cerebelo, el hipocampo, el mesencéfalo, la protuberancia (o puente de Varolio), el
20 bulbo raquídeo, el núcleo caudado, el putamen, el globo pálido, el tálamo y el hipotálamo, y puede mostrar una efectividad farmacológica en la corteza cerebral, el cerebelo, el hipocampo y el mesencéfalo en particular.

[0113] El péptido de afinidad con hTfR puede utilizarse para modificar la superficie de una vesícula que puede encapsular un fármaco. Los
25 ejemplos de las vesículas incluyen liposomas y nanopartículas lípidas (LNP). El liposoma es una vesícula esférica que tiene una bicapa lipídica,

y se utiliza un liposoma que contiene un fosfolípido, en particular fosfatidilcolina, como un constituyente. El liposoma además puede contener otros lípidos, como, por ejemplo, fosfatidiletanolamina de yema de huevo como un componente constituyente. Las

5 nanopartículas lípidas se refieren a partículas que tiene un diámetro de 10 nm a 1000 nm, por lo regular menos de aproximadamente 200 nm, y que tienen lípidos como componentes principales, y pueden encapsular una molécula hidrófoba (lipofílica), y tienen lípidos compatibles con un cuerpo vivo, como, por ejemplo, triglicérido, diglicérido, monoglicérido, 10 ácido graso y esteroide, como componentes constituyentes principales. El fármaco puede ser encerrado en dichas vesículas. Una nanopartícula lípida en la cual una superficie se modifica con el péptido de afinidad con hTfR puede producirse al crear un constituyente a partir de una nanopartícula lípida a la cual se une un péptido de afinidad con hTfR, y 15 añadirla a un proceso de producción de la nanopartícula lípida. Lo mismo aplica al liposoma.

[0114] en un caso donde la vesícula que encierra el fármaco se administra a un cuerpo vivo, una membrana que constituye la vesícula se fusiona con una membrana celular y el fármaco se libera en una célula.

20 Esto es, estas vesículas pueden utilizarse como un portador de un fármaco. En un caso donde el péptido de afinidad con hTfR se coloca sobre la superficie de dicha vesícula, ésta se une al hTfR en la célula endotelial microvascular del cerebro que constituye la barrera hematoencefálica a través del péptido, y el fármaco encerrado en la 25 vesícula puede liberarse en el parénquima cerebral, como, por ejemplo, el parénquima del cerebelo por la vesícula que se fusiona con la

membrana celular de la célula endotelial microvascular del cerebro o la vesícula que se captura en la célula por medio de endocitosis , entre otros.

[0115] En la presente memoria descriptiva, el término “vesícula” se refiere no solo al liposoma y las nanopartículas lípidas antes descritos, sino también a cualquier nano o micropartícula que puede utilizarse como un sistema de liberación de fármaco (DDS), como, por ejemplo, nanopartículas poliméricas, micelas, emulsiones, nanoemulsiones, microesferas, nanoesferas, microcápsulas, nanocápsulas, dendrímeros, nanogeles, nanopartículas metálicas, entre otros.

Ejemplos

[0116] En lo sucesivo, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los Ejemplos, pero la presente invención no se limita a dichos Ejemplos.

[0117] [Ejemplo 1 de Referencia] Producción del vector de expresión (producto de referencia) de péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab.

Una proteína de fusión conocida de un péptido de afinidad con hTfR y un trastuzumab se produjo por medio del método que se muestra en los Ejemplos de Referencia 1 y 2 para su uso como un producto de referencia. La proteína de fusión tiene la misma secuencia de aminoácido que aquella divulgada como péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 5 en WO2023/090409A.

[0118] Se digirió el pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega Corporation) con MluI y NotI. Un fragmento de ADN de un gen que tiene la secuencia de nucleótido establecida en SEQ ID NO: 44 y codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 43 en la cual un péptido de afinidad con hTfR 5 representado en SEQ

ID NO: 42 se unió con la terminal C de una cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 29 a través de un ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 24, el fragmento de ADN que tiene un sitio Mlul en al lado 5' y un sitio Notl en el sitio 3' del gen, se sintetizó de manera artificial. El vector de expresión de una proteína en el cual el péptido de afinidad con hTfR 5 y la cadena pesada de trastuzumab se unieron entre sí se produjo por medio de la digestión del fragmento de ADN con Mlul y Notl y que incorpora el fragmento de ADN digerido entre el sitio Mlul y el sitio Notl del pCI-neo Mammalian Expression Vector. El vector de expresión tiene por nombre pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(5).

[0119] Además, un fragmento de ADN de un gen que tiene la secuencia de nucleótido establecida en SEQ ID NO: 35 y codifica la cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 30, el fragmento de ADN que tiene un sitio Mlul en al lado 5' y un sitio Notl en el sitio 3' del gen, se sintetizó de manera artificial. El vector de expresión de la cadena ligera de trastuzumab se construyó al digerir el fragmento de ADN con Mlul y Notl, y al enlazar el fragmento de ADN digerido con el pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega Corporation) digerido con Mlul y Notl, el cual se preparó con antelación. El vector de expresión tiene por nombre pCI-neo-Trastuzumab(LC).

[0120] [Ejemplo 2 de Referencia] Producción del (producto de referencia) de péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab.

El pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(5) y pCI-neo-

Trastuzumab(LC), el cual se produjo en el Ejemplo 1 de Referencia, se transfectaron de manera simultánea a las células CHO-S que hace uso de ExpiCHO Expression System (Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto, y la proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 5 y la cadena pesada de trastuzumab se unieron entre sí y la cadena ligera de trastuzumab se coexpresaron en las células CHO-S. Esta célula expresa la proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 5 y el trastuzumab se fusionan entre sí y secreta la proteína en un medio de cultivo. En lo sucesivo, esta proteína de fusión es referida como péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 5. Esta célula se cultivo en la presencia de neomicina de acuerdo con el protocolo adjunto. De manera específica, las células CHO-S se suspendieron en 15 ml de un medio de cultivo, de forma que la concentración fue 6×10^6 células/ml, la suspensión se transfirió a un matraz cónico de 150 ml, y las células se cultivaron a 37 °C en un entorno húmedo que consiste en 5% de CO₂, y 95% de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm durante 1 día. El líquido alimentado y el líquido potenciador adjuntos al ExpiCHO Expression System se añadieron a los mismos, y las células se cultivaron a 32 °C en un entorno húmedo que consiste en 5% de CO₂ y 95% de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm durante 9 días para expresar el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 5. Después del cultivo, el medio de cultivo se centrifugó (3,000 xg, 5 minutos) para obtener un sobrenadante, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 µm (MiliporeSigma), el filtrado se recolectó como un sobrenadante de cultivo.

[0121] Una columna abierta llena con 1 ml de MabSelect SuRe LX

(Cytiva) se equilibró al pasar a través de 5 volúmenes de columna de 25 nM de solución amortiguador HEPES (pH 7.5) que contiene 50 mM de NaCl. Después, el sobrenadante de cultivo se aplica a la columna, y el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 5 se une a la resina. La columna se lavó al pasar a través de 5 volúmenes de columna de 25 mM de solución amortiguadora HEPES (pH 7.5) que contiene 50 mM de NaCl, y posteriormente el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 5 se eluyó al pasar 150 mM de Glicina (pH 3.0) que contiene 100 nM de NaCl. 1 M de Tris-HCl (pH 8.0) equivalente a 5% por volumen se añadió al eluido que contiene el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 5 para ajustar el pH a neutro. El disolvente el eluido se intercambia con amortiguador PBS(-) haciendo uso de una columna PD-10 (Cytiva Inc.). La solución obtenida se utilizó como un producto purificado del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 5, y éste se utilizó como péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab (producto de referencia).

[0122] [Ejemplo 1] Construcción de vector de expresión de hTfR

El uso de un Quick Clone cDNA (Clontech) de bazo humano como plantilla, un fragmento de gen que codifica un receptor de transferrina humana (hTfR) se amplificó por medio de PCR haciendo uso de un cebador hTfR5' (SEQ ID NO: 36) y un cebador hTfR3' (SEQ ID NO: 37). El fragmento genético amplificado que codifica hTfR se digirió con MluI y NotI, y el fragmento digerido se insertó entre MluI y NotI de un vector pCl-neo (Promega Corporation). El vector obtenido se nombró pCl-neo(hTfR). Después, el vector se digirió con MluI y NotI para cortar un fragmento genético que codifica hTfR, y el fragmento genético se incorporó entre MluI y NotI de pE-mIRES-GS-puro, el cual

es un vector de expresión descrito en WO2012/063799A para construir pE-mIRES-GS-puro(hTfR), el cual es un vector de expresión de hTfR.

[0123] [Ejemplo 2) Producción de hTfR recombinante.

El pE-mIRES-GS-puro(hTfR) se transfectó a células CHO-K1 a través de un método de electroporación, y posteriormente las células se cultivaron de manera selectiva haciendo uso de un medio de cultivo CD OPTICHO™ (Invitrogen) que contiene metionina sulfoximina (MSX) y puromicina para obtener las células que expresan hTfR recombinante. Las células de expresión de hTfR recombinante se cultivó para preparar un hTfR recombinante (rhTfR).

[0124] [Ejemplo 3] Producción de biblioteca de fagos.

Una alpaca se inmunizó haciendo uso de rhTfR preparado en el Ejemplo 2 como un antígeno. La sangre se recolectó a partir de la alpaca después de la inmunización, y linfocitos de sangre periférica se aislaron de la sangre. El ARN se extrajo de los linfocitos de sangre periférica, y el ARN se transcribió de manera inversa para obtener el ADNc. El uso de ADNc obtenido como una plantilla, un fragmento de ADN que contiene una secuencia de nucleótido que codifica una región variable de anticuerpo de cadena pesada se amplificó a través de un método PCR. El fragmento de ADN amplificado se incorporó a un fagémido, de forma que la región variable del anticuerpo de cadena pesada se presente sobre la superficie del fago en un caso donde el fragmento de ADN se empaqueta en el fago, y el fagémido se transfecta a Escherichia coli por medio de un método de electroporación. La Escherichia coli al cual el fagémido se ha transfectado se infectó de manera adicional con un fago auxiliar (M13K07), y posteriormente la Escherichia coli se cultivó para liberar el

fago en el medio de cultivo. Después de finalizar el cultivo, el sobrenadante de cultivo que contiene el fago se recolectó al centrifugar el medio de cultivo. El sobrenadante de cultivo que contiene el fago recolectado se utilizó como una biblioteca de fagos. La concentración de la librería de fagos fue 3.36×10^{13} PFU/ml.

[0125] [Ejemplo 4] Aislamiento de clones de fago que expresan un anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR.

Un fago (fago que expresa un anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR) que expresa una región variable de anticuerpo de cadena pesada que une de manera específica con hTfR se clonó a partir de la biblioteca de fagos producidos en el Ejemplo 3 a través de un método de cribado biológico (biopanning). En términos generales, la clonación se llevó a cabo tal y como se mencionará a continuación. Una solución que contiene rhTfR producida en el Ejemplo 2 se añadió a cada pocillo de la placa de microtitulación para inmovilizar el rhTfR sobre la placa. Después, cada pocillo se lavó tres veces con 0.05% de solución de PBST, y, posteriormente, un agente de bloqueo se añadió a cada pocillo para bloquear cada pocillo. Después, cada pocillo se lavó tres veces con 0.05% de solución de PBST, y una biblioteca de fagos diluida con un agente de bloqueo se añadió al mismo. Se permitió que la placa permanecer parada, y un fago que tiene un anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR sobre la superficie se unió con RhTfR. Después, cada pocillo se lavó 5 veces con 0.05% de solución de PBST para eliminar los fagos que no se unieron al rhTfR. Después, el fago unido con rhTfR se disoció del rhTfR al añadir un eluyente ácido, y el fago disociado se recolectó como una solución.

[0126] La solución recolectada se diluyó y añadió a una solución que contiene *Escherichia coli*, y se permitió al fago infectar la *Escherichia coli*. La *Escherichia coli* infectada con un fago se infectó de manera adicional con un fago auxiliar (M13K07), y posteriormente la *Escherichia coli* se cultivó para liberar el fago en el medio de cultivo. El fago se purificó haciendo uso de una solución PEG.

[0127] Se permitió al fago purificado infectar la *Escherichia coli*, y posteriormente la *Escherichia coli* infectada se cultivó en un medio de cultivo de gelatina. La *E. coli* que formó una sola colonia en el medio de cultivo se recolectó, se cultivó de manera adicional en el medio de cultivo y posteriormente se infectó con un fago auxiliar (M13K07) para liberar un fago en el medio de cultivo. El fago liberado en el medio de cultivo se recolectó en el sobrenadante de cultivo al centrifugar el medio de cultivo como un clon de fago que expresa un anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR. Cada clon de fago contenido en el sobrenadante de cultivo se purificó haciendo uso de una solución PEG.

[0128] [Ejemplo 5] Determinado de secuencia de aminoácido de región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR expresado por medio de cada clon de fago que expresa el anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR.

Los dos clones se seleccionaron a partir de los fagos que expresan un anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR aislados en el Ejemplo 4, y cada uno de los clones se nombraron Clon 1 y Clon 2. Un fagémido se purificó de cada clon, y se determinó la secuencia de nucleótido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR codificado por medio de cada fagémido purificado. Con base en lo anterior, se

determinó la secuencia de aminoácido de la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR expresado por cada clon. Aquí, el péptido que tiene la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR del Clon 1 se definió como péptido de afinidad con hTfR 1, y el péptido que tiene la región variable del anticuerpo de cadena pesada de anti-hTfR del Clon 2 se definió como péptido de afinidad con hTfR 3. Además, péptido de afinidad con hTfR 1 que tiene una secuencia de aminoácido humanizada se refirió como péptido de afinidad con hTfR 2. Las secuencias de aminoácido de péptidos de afinidad con hTfR 1 a 3 se muestran en la Tabla 1.

[0129] [Tabla 1]

Tabla 1 Secuencias de aminoácido de péptido con afinidad por hTfR 1 a 3

Péptido con afinidad por hTfR	Secuencias de aminoácido
1	SEQ ID NO: 4
2	SEQ ID NO: 5
3	SEQ ID NO: 6

[0130] Los péptidos de afinidad con hTfR 1 a 3 cada uno incluye CDR1 a 3. Las secuencias de aminoácido de los CDR del péptido de afinidad con hTfR 1 y el péptido de afinidad con hTfR 2 son las mismas. Tabla 2 muestra las secuencias de cada CDR.

[0131] [Tabla 2]

Tabla 2 SEQ ID NO de secuencia de aminoácido incluida en CDR1 a CDR3 del péptido con afinidad por hTfR 1 a 3 (ejemplos de secuencia de aminoácido de cada CDR)

Nombre	Secuencia de aminoácido		
	CDR1	CDR2	CDR3

Péptido con afinidad por hTfR 1	7, 8	9, 10	11, 12
Péptido con afinidad por hTfR 2	7, 8	9, 10	11, 12
Péptido con afinidad por hTfR 3	13, 14	15, 16	17, 18

[0132] [Ejemplo 6] Producción de péptidos de afinidad con hTfR 1 y 3.

Un fragmento de ADN que incluye un gen que codifica el péptido de afinidad con hTfR 1 al cual una etiqueta de péptido de afinidad con hTfR representada por SEQ ID NO: 41 se añadió a la terminal N se sintetizó de manera artificial, y se incorporó entre el sitio Mlul y el sitio NotI de pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega Corporation) para preparar un vector de expresión de péptido de afinidad con hTfR 1. El vector de expresión se transfectó a las células CHO-S haciendo uso de ExpiCHO Expression System (Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto, y el péptido de afinidad con hTfR 1 se expresó en las células CHO-S. Esta célula expresa el péptido de afinidad con hTfR 1 y secreta el péptido de afinidad con hTfR 1 al medio de cultivo. Esta célula se cultivó en la presencia de neomicina de acuerdo con el protocolo adjunto. De manera específica, las células CHO-S se suspendieron en 15 ml de un medio de cultivo, de forma que la concentración fue 6×10^6 células/ml, la suspensión se transfirió a un matraz cónico de 150 ml, y las células se cultivaron a 37 °C en un entorno húmedo que consiste en 5% de CO₂, y 95% de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm durante 1 día. El líquido alimentado y el líquido potenciador adjuntos al ExpiCHO Expression System se añadieron a los mismos, y las células se cultivaron a 32 °C en

un entorno húmedo que consiste en 5% de CO₂ y 95% de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm durante 9 días para expresar el péptido de afinidad con hTfR 1. Después del cultivo, el medio de cultivo se centrifugó (3,000 xg, 5 minutos) para obtener un sobrenadante, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 µm (MiliporeSigma), el filtrado se recolectó como un sobrenadante de cultivo. El péptido de afinidad con hTfR 1 se purificó a partir del sobrenadante de cultivo cultivado por medio del siguiente método para obtener un producto purificado.

[0133] Como una solución de equilibrio, 5 volúmenes de columna de 50 mM de solución de amortiguador Tris-HCl (pH 7.5) que contiene 150 mM de NaCl y 1 mM de CaCl₂ se pasó a través de una columna Anti-FLAG M1 Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich Co. LLC). Después, el sobrenadante de cultivo se aplica a una columna, y el péptido de afinidad con hTfR 1 fue absorbido a una columna de afinidad. Después, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de la solución de equilibrio. El péptido de afinidad con hTfR 1 se eluyó a partir de la columna con un eluyente (50 mM de solución amortiguador Tris-HCl (pH 7.5) que contiene 150 mM de NaCl). El péptido de afinidad con hTfR 1 eluido se utilizó como un producto purificado en los siguientes experimentos. Un producto purificado del péptido de afinidad con hTfR 3 también se obtuvo en la misma forma como en el péptido de afinidad con hTfR 1.

[0134] [Ejemplo 7] Evaluación de actividad de unión de los péptidos de afinidad con hTfR 1 y 3 con TfR humano, TfR de mono y TfR de ratón.

La medición de la actividad de unión de los péptidos de afinidad

con hTfR 1 y 3 con el TfR humano (hTfR), TfR de mono y TfR de ratón se llevó a cabo utilizando OctetRED96 (ForteBio, una división de Pall Corporation), el cual es un sistema de análisis de interacción biomolecular haciendo uso de interferometría de biocapa (BLI). El principio básico de interferometría de biocapa se describirá brevemente. En un caso donde la capa de la molécula biológica inmovilizada en la superficie del chip del sensor se irradia con una luz que tiene una longitud de onda específica, la luz se refleja a partir de dos superficies de la capa de la molécula biológica y la capa que sirve como una referencia en el interior, y una onda de interferencia se genera. Al unir las moléculas en la muestra de medición de las moléculas biológicas en la superficie del chip del sensor, el grosor de la capa en el extremo distal del sensor aumenta, y ocurre un cambio de longitud de onda en la onda de interferencia. Al medir el cambio en el cambio de longitud de onda, puede llevarse a cabo en tiempo real el análisis cinético y cuantificación del número de moléculas que se unen con las biomoléculas inmovilizadas en la superficie del chip del sensor. Por lo general, la medición se lleva a cabo de acuerdo con la operación manual sujeta a OctetRED96. Como el TfR humano, un hTfR recombinante que tiene una secuencia de aminoácido de la región extracelular del hTfR del residuo de cisteína en la posición 89 de la terminal N con el residuo de fenilalanina en la terminal N en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 1, a la cual se añadió una etiqueta de histidina en la terminal N, se utilizó (rhTfR, Sino Biological Inc.). Como el TfR de mono, un TfR de mono recombinante (TfR de mono r, Sino Biological Inc.) que tiene una secuencia de aminoácido de la región extracelular del TfR de mono

cangrejo del residuo de cisteína en la posición 89 de la terminal N con el residuo de fenilalanina en la terminal N en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 2, a la cual se añadió una etiqueta de histidina en la terminal N, se utilizó. Como el TfR de ratón, un TfR de ratón recombinante (TfR de ratón r) que tiene una secuencia de aminoácido de la región extracelular del TfR de ratón del residuo de cisteína en la posición 89 de la terminal N con el residuo de fenilalanina en la terminal N en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 3, a la cual se añadió una etiqueta de histidina en la terminal N, se utilizó.

[0135] Los productos purificados de los péptidos de afinidad con hTfR 1 y 3 obtenidos en el Ejemplo 6 se diluyeron con HBS-P + (10 mM de HEPES que contiene 150 mM de NaCl, 1% de base, 50 μ M de EDTA y 0.05% de tensoactivo P20) para preparar soluciones que tienen concentraciones de tres etapas de 10 a 40 mM. Estas soluciones se utilizaron como soluciones de muestra. El rhTfR, TfR de mono r, y TfR de ratón r se diluyeron cada uno con HBS-P + para preparar una solución de 15 μ g/ml, y cada una de las soluciones se utilizó como una solución hTfR-ECD (Histag), una solución TfR de mono-ECD (Histag) y una solución TfR de ratón-ECD (Histag).

[0136] La solución de muestra antes descrita se dispensó en una placa de 96 pocillos negra (Greiner Bio-One) en una cantidad de 200 μ L/pocillo. Además, la solución hTfR-ECD (Histag), la solución TfR de mono-ECD (Histag) y la solución TfR de ratón-ECD (Histag) antes preparadas se dispensaron en cada pocillo predeterminado en una cantidad de 200 μ L/pocillo. HBS-P + se dispense en cada uno de los pocillos de la referencia, la disociación y el lavado en una cantidad de

200 μ l/pocillo. 10 mM de Glicina-HCl (pH 1.7) se dispense en los pocillos para la regeneración en una cantidad de 200 μ l/pocillo. 0.5 mM de solución de NiCl_2 que contiene 1% de BSA se dispense en los pocillos para su activación en una cantidad de 200 μ l/pocillo. La placa y un biosensor (Biosensor/Ni-NTA: ForteBio, una división de Pall Corporation) se instalaron en posiciones predeterminadas de OctetRED96.

[0137] OctetRED96 se operó bajo las condiciones que se muestra en la Tabla 3 para adquirir datos, y posteriormente la curva de reacción de unión se ajustó a un modelo de unión de 1:1 o un modelo de unión de 2:1 utilizando el software de análisis adjunto con OctetRED96 para medir la constante de la tasa de asociación (k_{on}) y la constante de la tasa de disociación (k_{off}) de cada péptido de afinidad con hTfR a hTfR, TfR de mono y TfR de ratón, y se calculó la constante de disociación (K_D). La medición se llevó a cabo a una temperatura de 25 °C hasta 30 °C.

[0138] [Tabla 3]

Tabla 3 Condición de operación de Octet RED96

	Etapas	Tiempo de Contacto (segundos)	Tasa (rpm)	Valor de umbral
1	Regeneración	5	1000	-
2	Lavado	5	1000	-
Etapas 1 y 2 se repiten 6 veces.				
3	Activación	60	1000	1.0
4	Punto de referencia 1	120	1000	-
5	Carga	600	1000	-
6	Punto de referencia 2	150	1000	-
7	Asociación	120	1000	-
8	Disociación	200	1000	-
Etapas 1 a 8 se repiten hasta que se finaliza la medición de todas las muestras.				

[0139] La Tabla 4 muestra las constantes de disociación (K_D) de los

péptidos de afinidad con hTfR 1 y 3 con hTfR, TfR de mono y TfR de ratón. Como resultado, los valores K_D del péptido de afinidad con hTfR 1 para hTfR, TfR de mono y TfR de ratón se midieron cada uno como siendo 9.32×10^{-10} M, 8.24×10^{-9} M y 5.31×10^{-9} M. Además, los valores K_D del péptido de afinidad con hTfR 3 para hTfR, TfR de mono y TfR de ratón se midieron cada uno como siendo 4.40×10^{-9} M, 1.74×10^{-8} y 5.75×10^{-9} M. Estos resultados muestran que cada péptido de afinidad con hTfR tiene un valor K_D para hTfR de aproximadamente 1.0×10^{-9} M a 1.0×10^{-8} M, un valor K_D para TfR de mono de aproximadamente 5.0×10^{-9} M a 5.0×10^{-8} M y un valor de K_D para TfR de ratón de aproximadamente 1.0×10^{-9} M a 1.0×10^{-8} M.

[0140] [Tabla 4]

Tabla 4 Afinidad (valor KD) de péptidos con afinidad por hTfR 1 y 3 para hTfR, TfR de mono y TfR de ratón

Nombre	Humano	Mono	Ratón
Péptido con afinidad por hTfR 1	9.32 x10⁻¹⁰	8.24 x 10⁻⁹	5.31 x 10⁻⁹
Péptido con afinidad por hTfR 2	4.40 x 10⁻⁹	1.74 x 10⁻⁸	5.75 x 10⁻⁹

5 [0141] A partir de los resultados anteriores, se calculó un valor relativo de la constante de disociación de cada péptido de afinidad con hTfR con el TfR de mono o el TfR de ratón, en un caso donde el valor de la constante de disociación con el hTfR de cada péptido de afinidad con hTfR se estableció en 1 (Tabla 5). La afinidad relativa de cualquier

10 péptido de afinidad con hTfR al TfR de mono y TfR de ratón estuvo dentro de un rango de 1.0 a 10.0. Estos resultados muestran que la afinidad por hTfR y la afinidad por TfR de mono y el TfR de ratón son aproximadamente la misma. Por lo tanto, ya que se predice con naturalidad que en la farmacocinética in vivo donde se administra a un

15 mono o a un ratón estos péptidos de afinidad con hTfR es muy próxima a la farmacocinética in vivo donde se administra a un humano, si se llegase a desarrollar un fármaco aplicando éstas, una parte de los ensayos no clínicos, como, por ejemplo, pruebas farmacocinéticas del fármaco, puede llevarse a cabo utilizando un mono, un ratón o

20 ambos. Por lo tanto, el desarrollo del producto farmacéutico puede promoverse de manera considerable.

[0142] [Tabla 5]

Tabla 5 Valor relativo de afinidad de péptido con afinidad por hTfR

1 y 3 para TfR de mono y TfR de ratón

Nombre	Valor relativo	
	Mono	Ratón
Péptido con afinidad por hTfR 1	8.84	5.70
Péptido con afinidad por hTfR 3	3.95	1.31

[0143] [Ejemplo 8] Producción del vector de expresión de péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab.

5 Se digirió el pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega Corporation) con Mlul y NotI. Un fragmento de ADN de un gen que tiene la secuencia de nucleótido establecida en SEQ ID NO: 34 y codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 31, en el cual el péptido de afinidad con hTfR 1 se unió con la

10 terminal C de una cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 29 a través de un ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 24, el fragmento de ADN que tiene un sitio Mlul en el lado 5' y un sitio NotI en el sitio 3' del gen, se sintetizó de manera artificial. El

15 vector de expresión de una proteína en el cual el péptido de afinidad con hTfR 1 y la cadena pesada de trastuzumab se unieron entre sí se produjo por medio de la digestión del fragmento de ADN con Mlul y NotI y que incorpora el fragmento de ADN digerido entre el sitio Mlul y el sitio NotI del pCI-neo Mammalian Expression Vector. El vector de expresión

20 tiene por nombre pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1). De igual forma, para el péptido de afinidad con hTfR 2, también puede sintetizarse de manera artificial un fragmento de ADN que incluye un gen que codifica

una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 2 se unió con la cadena pesada del trastuzumab. El fragmento de ADN se digirió con Mlul y Notl, y se incorporó entre el sitio Mlul y el sitio Notl del PCI-neo Mammalian Expression Vector, con lo cual se produjo un vector de expresión de una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 2 y la cadena pesada del trastuzumab se unieron entre sí. El vector de expresión producido tiene por nombre pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(2). De igual forma, para el péptido de afinidad con hTfR 3, también puede sintetizarse de manera artificial un fragmento de ADN que incluye un gen que codifica una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 3 se unió con la cadena pesada del trastuzumab. El fragmento de ADN se digirió con Mlul y Notl, y se incorporó entre el sitio Mlul y el sitio Notl del PCI-neo Mammalian Expression Vector, con lo cual se produjo un vector de expresión de una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 3 y la cadena pesada del trastuzumab se unieron entre sí. El vector de expresión producido tiene por nombre pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(3).

[0144] Además, un fragmento de ADN de un gen que tiene la secuencia de nucleótido establecida en SEQ ID NO: 35 y codifica la cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 30, el fragmento de ADN que tiene un sitio Mlul en el lado 5' y un sitio Notl en el sitio 3' del gen, se sintetizó de manera artificial. El vector de expresión de la cadena ligera de trastuzumab se construyó al digerir el fragmento de ADN con Mlul y Notl, y al enlazar el fragmento de ADN digerido con el pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega Corporation) digerido con Mlul y Notl, el cual se preparó con

antelación. El vector de expresión tiene por nombre pCl-neo-Trastuzumab(LC).

[0145] [Ejemplo 9] Producción del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab.

5 El pCl-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1) y pCl-neo-Trastuzumab(LC), el cual se produjo en el Ejemplo 8, se transfectaron de manera simultánea a las células CHO-S que hace uso de ExpiCHO Expression System (Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto, y la proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR

10 1 y la cadena pesada de trastuzumab se unieron entre sí y la cadena ligera de trastuzumab se coexpresaron en las células CHO-S. Esta célula expresa la proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR y el trastuzumab se fusionan entre sí y secreta la proteína en un medio de cultivo. En lo sucesivo, esta proteína de fusión es referida como péptido

15 de afinidad con hTfR-trastuzumab 1. Esta célula se cultivo en la presencia de neomicina de acuerdo con el protocolo adjunto. De manera específica, las células CHO-S se suspendieron en 15 ml de un medio de cultivo, de forma que la concentración fue 6×10^6 células/ml, la suspensión se transfirió a un matraz cónico de 150 ml, y las células se

20 cultivaron a 37 °C en un entorno húmedo que consiste en 5% de CO₂, y 95% de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm durante 1 día. El líquido alimentado y el líquido potenciador adjuntos al ExpiCHO Expression System se añadieron a los mismos, y las células se cultivaron a 32 °C en un entorno húmedo que consiste en 5% de CO₂

25 y 95% de aire a una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm durante 9 días para expresar el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab

1. Después del cultivo, el medio de cultivo se centrifugó (3,000 xg, 5 minutos) para obtener un sobrenadante, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 μ m (MiliporeSigma), el filtrado se recolectó como un sobrenadante de cultivo.

- 5 [0146] Una columna abierta llena con 1 ml de MabSelect SuRe LX (Cytiva) se equilibró al pasar a través de 5 volúmenes de columna de 25 nM de solución amortiguador HEPES (pH 7.5) que contiene 50 mM de NaCl. Después, el sobrenadante de cultivo se aplica a una columna, y el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 se une a la resina. La
- 10 columna se lavó al pasar a través de 5 volúmenes de columna de 25 mM de solución amortiguadora HEPES (pH 7.5) que contiene 50 mM de NaCl, y posteriormente el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 se eluyó al pasar 150 mM de Glicina (pH 3.0) que contiene 100 nM de NaCl. 1
- 15 M de Tris-HCl (pH 8.0) equivalente a 5% por volumen se añadió al eluido que contiene el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 para ajustar el pH a neutro. El disolvente el eluido se intercambio con amortiguador PBS(-) haciendo uso de una columna PD-10 (Cytiva Inc.). La solución obtenida se utilizó como un producto purificado del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 en los siguientes experimentos.
- 20 [0147] Además, pCl-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(2) también se transfectó a células CHO-S de manera simultánea con pCl-neo-Trastuzumab(LC) como en el caso de pCl-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1), y una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 2 y la
- 25 cadena pesada de trastuzumab se unieron y la cadena ligera se coexpresaron en las células CHO-S. Esta célula expresa una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 2 y el trastuzumab se fusionan

entre sí y secreta la proteína en un medio de cultivo. En lo sucesivo, la proteína de fusión expresada por medio de esta célula es referida como el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2. Un producto purificado del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 también se obtuvo en la misma forma como en el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1. Además, pCl-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(3) también se transfectó a células CHO-S de manera simultánea con pCl-neo-Trastuzumab(LC) como en el caso de pCl-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1), y una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 3 y la cadena pesada de trastuzumab se unieron y la cadena ligera se coexpresaron en las células CHO-S. Esta célula expresa una proteína en la cual el péptido de afinidad con hTfR 3 y el trastuzumab se fusionan entre sí y secreta la proteína en un medio de cultivo. En lo sucesivo, la proteína de fusión expresada por medio de esta célula es referida como el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 3. Un producto purificado del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 3 también se obtuvo en la misma forma como en el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1. El péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1, 2 y 3 son referidos en su conjunto como péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab.

[0148] [Ejemplo 10] Evaluación de actividad de unión de péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab de un TfR de ratón y hTfR.

La afinidad del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 y 3 producidos en el Ejemplo 9 por TfR de ratón se midió de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 7. Como resultado, las constantes de disociación (K_D) para la afinidad del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 y 3 por el TfR de ratón se midieron cada uno como siendo

4.03 x 10⁻¹⁰ M y 3.44 x 10⁻¹⁰ M. Estos resultados muestran que las proteínas de fusión en las cuales se fusionaron diferentes proteínas con la terminal N de los péptidos de afinidad con hTfR 1 y 3 mantuvieron la afinidad por el TfR de ratón. Además, la afinidad del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 y 3 producidos en el Ejemplo 9 por hTfR se midió de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 7. Como resultado, las constantes de disociación (K_D) para la afinidad del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 y 3 por el hTfR se midieron cada uno como siendo 1.55 x 10⁻¹⁰ M y 2.28 x 10⁻¹⁰ M. Estos resultados muestran que las proteínas de fusión en las cuales se fusionaron diferentes proteínas con la terminal N de los péptidos de afinidad con hTfR 2 y 3 mantuvieron la afinidad por el hTfR.

[0149] [Ejemplo 11] Evaluación de transferibilidad cerebral del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab haciendo uso de un ratón del tipo silvestre.

Después, en un caso donde el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 y 3 se administraron cada uno de manera intravenosa, se evaluó si el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 y 3 pasaron o no a través del BHE y se transfirieron hasta el cerebro, haciendo uso de un ratón del tipo silvestre (ratón TS).

[0150] Los productos purificados del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 y 3 obtenidos en el Ejemplo 9 se administraron cada uno de manera intravenosa a dos ratones TS machos, y la dosis fue de 5 mg/kg. Además, como un control negativo, el trastuzumab se administró de manera intravenosa a dos ratones TS machos, y la dosis fue de 5 mg/kg. Asimismo, el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab

(producto de referencia) producidos en el Ejemplo 2 de Referencia se administró de manera intravenosa a dos ratones hTfR-KI machos, y la dosis fue 5 mg/kg. Seis horas después de la administración, el ratón se sometió a eutanasia, y posteriormente la sangre periférica se recolectó, y a continuación el cuerpo entero se perfundió con una solución salina fisiológica, y se recolectó el cerebro (que incluye la corteza cerebral y el cerebelo). Después de medir el peso (peso húmedo) del cerebro extirpado, el cerebro se dividió en el plano sagital, y una parte se utilizó para medir la concentración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab en el tejido, y la otra parte se utilizó para la tinción inmunohistoquímica.

[0151] El tejido cerebral para la medición de la concentración se homogeneizó en T-PER (Thermo Fisher Scientific, Inc.) que contiene Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldric Co. LLC). El homogenato obtenido se centrifugó (3,000 xg, 5 minutos), y se recolectó el sobrenadante. Las cantidades del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab y el trastuzumab contenido en el sobrenadante del homogenato se midió a través del siguiente método. Primero, 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 mezclaron en cantidades iguales, 25 µl de la mezcla se dispensó en una placa de muestreo (placa de muestra BM6025 de 96 pocillos, con pocillos de fondo amplio V, BM Equipment Co., Ltd.), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora con una mezclador de microplacas para preparar una solución de reacción. 150 µl de amortiguador de bloqueo Super Block en PBS (37515, Thermo Fisher Scientific, Inc.) se

añadió a una placa Streptavidin Gold (Meso Scale Diagnostics) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora haciendo uso de un mezclador de microplacas para bloquear la placa. Después de su lavado con PBST, 25 µl de la solución de reacción se añadió al mismo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora haciendo uso de un mezclador de microplacas. Después, 150 µl de amortiguador T Read (Meso Scale Diagnostics, Ltd.) se añadió a cada pocillo, y la cantidad de luminiscencia de cada pocillo se evaluó haciendo uso de un lector Sector™ Imager 6000. Una curva de calibración se creó a partir del valor medido de la muestra estándar del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab de una concentración conocida, y el valor medido de cada muestra se interpoló en la curva de calibración para calcular la cantidad del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab contenido en el cerebro por gramo de peso (peso húmedo) (la concentración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab en el tejido cerebral). Los resultados se muestran en la Fig. 1. En comparación con trastuzumab, las concentraciones del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 y 3 en el tejido cerebral fueron cada una aproximadamente 26 veces y aproximadamente 21 veces. Además, incluso en comparación con el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab (producto de referencia), las concentraciones del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 y 3 en el tejido cerebral fueron cada una aproximadamente 2.0 veces y aproximadamente 1.6 veces. Estos resultados indican que el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 y 3 tiene extraordinariamente una propiedad que pasa a través del B y que se acumula en el tejido cerebral.

[0152] La tinción inmunohistoquímica del péptido de afinidad con

hTfR del péptido de afinidad con hTfR en el tejido cerebral por lo general se llevó a cabo por medio del siguiente procedimiento. El tejido cerebral recolectado para la tinción inmunohistoquímica se sumergió en un compuesto OCT (Sakura Finetek Japan Co., Ltd.), se congeló rápidamente a -80 °C haciendo uso de Histo-Tek PINO (Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) y se produjo un bloque congelado del tejido. El bloque congelado se cortó de manera fina a 4 µm y se sujetó a un portaobjetos revestido con MAS (fabricado por Matsunami Glass Ind., Ltd.). El portaobjetos se sumergió en 4% de paraformaldehído (Wako Chemical Corporation) a 4 °C durante 5 minutos, y se fijó la muestra. Después, el portaobjetos se sumergió en PBS que contiene 1% de BSA para llevar a cabo el bloqueo. Después, un Anticuerpo de cadena ligera y pesada-Goat Anti hIgG (Behtyl Laboratories, Inc.) adecuadamente diluidos se añadieron gota por gota a la rebanada delgada de tejido y se permitió reaccionar durante 1 hora. Después la solución Fluorescein Amplification Working Solution contenida en un equipo TSA-Plus Fluorescence (PerkinElmer Inc.) se añadió gota por gota a la rebanada delgada de tejido, y dicha rebanada delgada de tejido se protegió de la luz y se permitió reaccionar durante 15 minutos. Después el Anti-Fluorescein-HRP contenido en CSA II Biotin-FRFree Tyramide Signal Amplification System (Dako) se añadió gota por gota a la rebanada delgada de tejido y se permitió reaccionar durante 15 minutos. Después, la rebanada delgada de tejido se hizo reaccionar con un sustrato DAB (3,3'-diaminobencidina, Vector Laboratories, Inc.) y se forma un color. Después, la rebanada delgada de tejido se contrastó con la hematoxilina de Mayer (Merck) y se deshidrató, aclaró y encerró para posteriormente

observarse con un microscopio óptico.

[0153] La Fig. 2 es una imagen de tinción del tejido recolectado 6 horas después de la administración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab. En el tejido del cerebelo del ratón al cual se administró trastuzumab como un control negativo, no se observó alguna tinción, lo cual indicó que el trastuzumab administrado por inyección intravenosa no alcanzó el parénquima cerebral del cerebelo y que la tinción de fondo fue casi inexistente (Fig. 2 (a)). Por otro lado, en el tejido del cerebelo del ratón al cual se administró el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1, se observó tinción en el parénquima cerebral, y se mostró que el trastuzumab 1 administrado por inyección intravenosa alcanzó el parénquima cerebral del cerebelo (Fig. 2 (b)). También se observó la tinción del parénquima cerebral en el tejido del cerebelo del ratón al cual se administró el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 3, y se demostró que el trastuzumab 3, el cual se administró por inyección intravenosa, también alcanzó el parénquima del cerebelo (Fig. 2 (c)). En el tejido del cerebelo del ratón al cual se administró el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab (producto de referencia), se observó tinción en el parénquima cerebral, y se mostró que el trastuzumab (producto de referencia) por inyección intravenosa también alcanzó el parénquima cerebral del cerebelo (Fig. 2 (b)). Aquí, en un caso donde la intensidad de tinción del tejido del cerebelo del ratón al cual se administró cualquiera de los trastuzumab 1 o 3, se comparó con la intensidad de tinción del tejido de cerebelo del ratón al cual se administró el trastuzumab (producto de referencia), puede confirmarse con facilidad que la intensidad de tinción del tejido de cerebelo del ratón al cual

cualquiera de los trastuzumab 1 o 3 se administró es considerablemente más alta. Estos resultados indican que el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 1 y 3 alcanzaron considerablemente el parénquima cerebral del cerebelo al pasar a través del BHE.

5 [0154] [Ejemplo 12] Evaluación de transferibilidad cerebral 1 del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab haciendo uso de un ratón knock-in de hTfR.

Ya sea que el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab pase o no a través del BHE y migre al cerebro al unirse con el hTfR en un caso
10 en donde el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab se administra por inyección intravenosa, puede evaluarse al utilizar un ratón knock-in de hTfR (ratón hTfR-KI) en el cual un gen que codifica la región extracelular de un receptor de transferrina de ratón se sustituye con un gen que codifica la región extracelular de un gen receptor de transferrina humana.
15 El ratón hTfR-KI puede producirse generalmente por medio del siguiente método.

[0155] Un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótido establecida en SEQ ID NO: 38, en la cual un gen de resistencia de neomicina interpuesto por una secuencia loxP se configura en el lado 3'
20 de ADNC que codifica un hTfR quimérico, en el cual una región intracelular es una secuencia de aminoácido de hTfR de ratón y una región extracelular es una secuencia de aminoácido de hTfR humano, se sintetiza de manera química. Este fragmento de ADN se incorpora a un vector de dirección que tiene una secuencia de nucleótido establecida en
25 SEQ ID NO: 39 como una secuencia de brazo 5' y la secuencia de nucleótido establecida en SEQ ID NO: 40 como una secuencia de brazo

3' a través de un método normal, y un vector de dirección se transfiere a células ES de ratón por medio de un método de electroporación. Se seleccionan las células ES de ratón después de la transferencia genética se cultivó de manera selectiva en la presencia de neomicina, y las células

5 ES de ratón en las cuales el vector de dirección se incorpora en el cromosoma por medio de recombinación homóloga. Las células ES de ratón genéticamente recombinadas y obtenidas se inyectan a un embrión de etapa de 8 células (embrión huésped) de un ratón ICR, y el embrión se trasplantó a un ratón pseudopreñado (ratón receptor) obtenido al

10 aparearse con un rato en el cual se liga el conducto deferente. Se determina el color de revestimiento de la descendencia obtenida (ratón quimera), y se clasifica un individuo en el cual las células ES contribuyen con la formación del cuerpo vivo con alta efectividad, esto es, un individuo que tiene una alta proporción de pelo blanco con respecto a la

15 totalidad del pelo. El ratón quimera individual se cruza con un ratón ICR para obtener un ratón F1. Se clasifica el ratón F1 blanco, y se analiza el ADN extraído del tejido de la cola, y se define un ratón en el cual el gen de receptor de transferrina de ratón se reemplaza con el hTfR quimérico en el cromosoma como un ratón hTfR-KI.

20 [0156] El producto purificado del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab obtenido en el Ejemplo 9 se administra de manera intravenosa al ratón hTfR-KI de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 11. En lo sucesivo, al llevar a cabo la evaluación en cada tejido recolectado del ratón hTfR-KI de acuerdo con los métodos descritos en

25 el Ejemplo 11 y el Ejemplo 12, es posible evaluar si el producto purificado del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab ha llegado al

cerebro o no.

[0157] [Ejemplo 13] Evaluación de transferibilidad cerebral del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab haciendo uso de un mono cangrejo.

La transferibilidad del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab puede evaluarse haciendo uso de monos cangrejo. El producto purificado del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab obtenido en el Ejemplo 9 y el trastuzumab se administraron de manera intravenosa a cada mono cangrejo macho (*Macaca fascicularis*), y la dosis es 5 mg/kg. Además, como un control, el mismo volumen de la solución salina fisiológica se administró de manera intravenosa a un mono cangrejo macho. Después de 20 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 8 horas a partir de la administración, la sangre periférica se recolecta, y las concentraciones del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 5 y el trastuzumab contenidos en la sangre periférica se miden por medio del método descrito en el Ejemplo 11. A partir de los valores medidos, se calcularon C_{max} ($\mu\text{g/ml}$), AUC_{0-8h} ($\mu\text{g/h/m}$), and $t_{1/2\beta}$ (h).

[0158] 8 horas después de la administración, el cuerpo vivo del mono cangrejo se perfundió con una solución salina fisiológica. Después de la perfusión, se extirpo el tejido cerebral, incluyendo la médula oblongada y varios órganos. Las concentraciones del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab y el trastuzumab contenido en el tejido cerebral y varios órganos extirpados se midieron a través del método descrito en el Ejemplo 11.

[0159] Para el tejido cerebral, éste se divide en la corteza cerebral, el cerebelo, el hipocampo, el mesencéfalo, la protuberancia (puente de Varolio), el bulbo raquídeo, el núcleo caudado, el putamen, el globo

pálido, el tálamo, el hipotálamo, la médula espinal cervical, la médula espinal torácica y la médula espinal lumbar, y la medición se lleva a cabo para cada uno de los tejidos cerebrales divididos. Además, para los
5 varios órganos, la retina, el hígado, el riñón, el corazón (ventrículo izquierdo), el corazón (válvula aórtica), el pulmón, la médula ósea, el bazo, el timo, el testículo, la próstata, el cuádriceps femoral, el músculo extensor digital largo (EDL), el músculo sóleo, el tríceps braquial y el diafragma se recolectaron y midieron para cada uno.

[0160] [Ejemplo 14] Evaluación de transferibilidad cerebral 2 del
10 péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab haciendo uso de un ratón knock-in de hTfR.

Ya sea que el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab pase o no a través de la BHE y migre al cerebro en un caso en donde el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 y 3 se administra cada uno por
15 inyección intravenosa, se evaluó al utilizar un ratón knock-in de hTfR (ratón hTfR-KI) en el cual un gen que codifica una región extracelular de un receptor de transferrina de ratón se sustituye con un gen que codifica una región extracelular de un gen receptor de transferrina humana.

[0161] Los productos purificados del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 y 3 obtenidos en el Ejemplo 9 se administraron de manera
20 intravenosa a cada uno de 2 a 3 ratones hTfR-KI machos (20 a 26 semanas de edad), y la dosis fue 5 mg/kg. Además, como un control negativo, el trastuzumab se administró de manera intravenosa a dos ratones del tipo silvestre machos (ratones TS), y la dosis fue de 5 mg/kg. Seis horas
25 después de la administración, todos los ratones se sometieron a eutanasia, y posteriormente la sangre periférica se recolectó, y a continuación el

cuerpo entero se perfundió con una solución salina fisiológica, y se recolectó el cerebro (que incluye la corteza cerebral y el cerebelo). Después de medir el peso (peso húmedo) del cerebro extirpado, el cerebro se dividió en el plano sagital, y una parte se utilizó para medir las concentraciones del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 y 3 en el tejido, y la otra parte se utilizó para la tinción inmunohistoquímica.

[0162] El tejido cerebral para la medición de la concentración se homogeneizó en T-PER (Thermo Fisher Scientific, Inc.) que contiene Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldric Co. LLC). El homogenato obtenido se centrifugó (3,000 xg, 5 minutos), y se recolectó el sobrenadante. Las cantidades del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 o 3, o el trastuzumab contenido en el sobrenadante del homogenato se midió a través del siguiente método. Primero, 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 mezclaron en cantidades iguales, 25 µl de la mezcla se dispensó en una placa de muestreo (placa de muestra BM6025 de 96 pocillos, con pocillos de fondo amplio V, BM Equipment Co., Ltd.), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora con una mezclador de microplacas para preparar una solución de reacción. 150 µl de amortiguador de bloqueo Super Block en PBS (37515, Thermo Fisher Scientific, Inc.) se añadió a una placa Streptavidin Gold (Meso Scale Diagnostics) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora haciendo uso de un mezclador de microplacas para bloquear la placa. Después de su lavado con PBST, 25 µl de la solución de reacción se añadió al mismo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora haciendo uso de un mezclador de

microplacas. Después, 150 µl de amortiguador T Read (Meso Scale Diagnostics, Ltd.) se añadió a cada pocillo, y la cantidad de luminiscencia de cada pocillo se evaluó haciendo uso de un lector Sector™ Imager 6000. Una curva de calibración se creó a partir del valor medido de la muestra estándar del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 o 3, o trastuzumab de una concentración conocida, y el valor medido de cada muestra se interpoló en la curva de calibración para calcular la cantidad del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 o 3, trastuzumab contenido en el cerebro por gramo de peso (peso húmedo) (la concentración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 o 3, trastuzumab en el tejido cerebral). Los resultados se muestran en la Fig. 3. En comparación con trastuzumab, las concentraciones del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2 y 3 en el tejido cerebral fueron cada una aproximadamente 16 veces y aproximadamente 15 veces. Estos resultados indican que el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab tiene una propiedad que pasa a través del B y que se acumula en el tejido cerebral.

[0163] Después, la tinción inmunohistoquímica del péptido de afinidad con hTfR del péptido de afinidad con hTfR en el tejido cerebral se llevó a cabo por medio del siguiente procedimiento. El tejido cerebral recolectado para la tinción inmunohistoquímica se sumergió en un compuesto OCT (Sakura Finetek Japan Co., Ltd.), se congeló rápidamente a -80 °C haciendo uso de Histo-Tek PINO (Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) y se produjo un bloque congelado del tejido. El bloque congelado se cortó de manera fina a 4 µm y se sujetó a un portaobjetos revestido con MAS (fabricado por Matsunami Glass Ind., Ltd.). El

portaobjetos se sumergió en 4% de paraformaldehído (Wako Chemical Corporation) a 4 °C durante 5 minutos, y se fijó la muestra. Después, el portaobjetos se sumergió en PBS que contiene 1% de BSA para llevar a cabo el bloqueo. Después, un Anticuerpo de cadena ligera y pesada-Goat Anti hIgG (Behtyl Laboratories, Inc.) adecuadamente diluidos se añadieron gota por gota a la rebanada delgada de tejido y se permitió reaccionar durante 1 hora. Después la solución Fluorescein Amplification Working Solution contenida en un equipo TSA-Plus Fluorescence (PerkinElmer Inc.) se añadió gota por gota a la rebanada delgada de tejido, y dicha rebanada delgada de tejido se protegió de la luz y se permitió reaccionar durante 15 minutos. Después el Anti-Fluorescein-HRP contenido en CSA II Biotin-FR_{ee} Tyramide Signal Amplification System (Dako) se añadió gota por gota a la rebanada delgada de tejido y se permitió reaccionar durante 15 minutos. Después, la rebanada delgada de tejido se hizo reaccionar con un sustrato DAB (3,3'-diaminobencidina, Vector Laboratories, Inc.) y se forma un color. Después, la rebanada delgada de tejido se contrastó con la hematoxilina de Mayer (Merck) y se deshidrato, aclaró y encerró para posteriormente observarse con un microscopio óptico.

[0164] La Fig. 4 muestra una imagen de tinción de un tejido recolectado 6 horas después de la administración del péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab. 2 o 3, o trastuzumab. En el tejido del cerebelo del ratón al cual se administró trastuzumab como un control negativo, no se observó alguna tinción, lo cual indicó que el trastuzumab administrado por inyección intravenosa no alcanzó el parénquima cerebral del cerebelo y que la tinción de fondo fue casi inexistente (Fig. 4 (a)). Por otro lado,

en el tejido del cerebelo del ratón al cual se administró el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 2, se observó tinción en el parénquima cerebral, y se mostró que el trastuzumab 1 administrado por inyección intravenosa alcanzó el parénquima cerebral del cerebelo (Fig. 4 (b)).

5 También se observó la tinción del parénquima cerebral en el tejido del cerebelo del ratón al cual se administró el péptido de afinidad con hTfR-trastuzumab 3, y se demostró que el trastuzumab 3, el cual se administró por inyección intravenosa, también alcanzó el parénquima del cerebelo (Fig. 4 (c)).

10 **Aplicación Industrial**

[0165] De acuerdo con una modalidad de la presente invención, es posible proporcionar un fármaco capaz de mostrar un efecto en el sistema nervioso central al pasar a través de la barrera hematoencefálica, en la cual un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana se une

15 con una sustancia farmacológicamente activa.

Lista de Referencia

[0166] 1: vaso sanguíneo

2: parénquima cerebral

Texto Libre de Listado de Secuencia

20 [0167] SEQ ID NO: 1: secuencia de aminoácido de receptor de transferrina humana

SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácido de receptor de transferrina mono cangrejo

SEQ ID NO: 3: secuencia de aminoácido de receptor de

25 transferrina de ratón

SEQ ID NO: 4: secuencia de aminoácido de péptido de afinidad

con hTfR 1

SEQ ID NO: 5: secuencia de aminoácido de péptido de afinidad
con hTfR 2

5 SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácido de péptido de afinidad
con hTfR 3

SEQ ID NO: 7: secuencia de aminoácido 1 de CDR1 de péptidos
de afinidad con hTfR 1 y 2

SEQ ID NO: 8: secuencia de aminoácido 2 de CDR1 de péptidos
de afinidad con hTfR 1 y 2

10 SEQ ID NO: 9: secuencia de aminoácido 1 de CDR2 de péptidos
de afinidad con hTfR 1 y 2

SEQ ID NO: 10: secuencia de aminoácido 2 de CDR2 de
péptidos de afinidad con hTfR 1 y 2

15 SEQ ID NO: 11: secuencia de aminoácido 1 de CDR3 de
péptidos de afinidad con hTfR 1 y 2

SEQ ID NO: 12: secuencia de aminoácido 2 de CDR3 de
péptidos de afinidad con hTfR 1 y 2

SEQ ID NO: 13: secuencia de aminoácido 1 de CDR1 de péptido
de afinidad con hTfR 3

20 SEQ ID NO: 14: secuencia de aminoácido 2 de CDR1 de péptido
de afinidad con hTfR 3

SEQ ID NO: 15: secuencia de aminoácido 1 de CDR2 de péptido
de afinidad con hTfR 3

25 SEQ ID NO: 16: secuencia de aminoácido 2 de CDR2 de péptido
de afinidad con hTfR 3

SEQ ID NO: 17: secuencia de aminoácido 1 de CDR3 de péptido

de afinidad con hTfR 3

SEQ ID NO: 18: secuencia de aminoácido 2 de CDR3 de péptido
de afinidad con hTfR 3

SEQ ID NO: 19: secuencia de aminoácido de ligador peptídico

5 1

SEQ ID NO: 20: secuencia de aminoácido de ligador peptídico

2

SEQ ID NO: 21: secuencia de aminoácido de ligador peptídico

3

10 SEQ ID NO: 22: secuencia de aminoácido de ligador peptídico

4

SEQ ID NO: 23: secuencia de aminoácido de ligador peptídico

5

SEQ ID NO: 24: secuencia de aminoácido de ligador peptídico

15 6

SEQ ID NO: 25: secuencia de aminoácido de ligador peptídico

7

SEQ ID NO: 26: un ejemplo de secuencia de aminoácido de
región Fc de IgG humana

20 SEQ ID NO: 27: secuencia de aminoácido de seroalbúmina
humana

SEQ ID NO: 28: dominio de unión a albúmina de proteína
derivada de la cepa Streptococcus G418

25 SEQ ID NO: 29: secuencia de aminoácido de cadena pesada de
trastuzumab

SEQ ID NO: 30: secuencia de aminoácido de cadena ligera de

trastuzumab

SEQ ID NO: 31: secuencia de aminoácido de proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 1 y cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO: 32: secuencia de aminoácido de proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 2 y cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO: 33: secuencia de aminoácido de proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 3 y cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO: 34: secuencia de nucleótido de ADN que codifica proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 1 y cadena pesada de trastuzumab, secuencia sintética

SEQ ID NO: 35: secuencia de nucleótido de ADN que codifica una cadena ligera de trastuzumab, secuencia sintética

SEQ ID NO: 36: secuencia de nucleótido de cebador hTfR5', secuencia sintética

SEQ ID NO: 37: secuencia de nucleótido de cebador hTfR3', secuencia sintética

SEQ ID NO: 38: secuencia de nucleótido de ADN en la cual el gen de resistencia contra neomicina interpuesto por medio de las secuencias IoxP en el lado 3' de ADNc que codifica el hTfR quimérico, secuencia sintética

SEQ ID NO: 39: secuencia de nucleótido de brazo 5' del vector de dirección, secuencia sintética

SEQ ID NO: 40: secuencia de nucleótido de brazo 3' del vector de dirección, secuencia sintética

SEQ ID NO: 41: etiqueta peptídica

SEQ ID NO: 42: secuencia de aminoácido de péptido de afinidad

con hTfR 5

SEQ ID NO: 43: secuencia de aminoácido de proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 5 y cadena pesada de trastuzumab

5 SEQ ID NO: 44: secuencia de nucleótido de ADN que codifica proteína de fusión de péptido de afinidad con hTfR 5 y cadena pesada de trastuzumab, secuencia sintética

Listado de Secuencias

REIVINDICACIONES

[Reivindicación 1]

Un péptido que tiene una afinidad por un receptor de transferrina humana (un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana) que
5 comprende una región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3.

en donde el péptido se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) y (2),

10 (1) un péptido, en el cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido
15 establecida en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12, y

(2) un péptido, en el cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, y la
20 secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

[Reivindicación 2]

Un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana, el cual es un péptido seleccionado a partir del grupo que consiste en los
25 siguientes (1) a (3),

(1) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de

secuencia de aminoácido a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 4, y que tiene tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3, las cuales tienen las secuencias de aminoácido que se muestra en (1) de acuerdo con la reivindicación 1,

(2) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia de aminoácido a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5, y que tiene tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3, las cuales tienen las secuencias de aminoácido que se muestra en (1) de acuerdo con la reivindicación 1, y

(3) un péptido que tiene 80% o más de una identidad de secuencia de aminoácido a la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 6, y que tiene tres regiones de determinación complementarias de CDR1, CDR2 y CDR3, las cuales tienen las secuencias de aminoácido que se muestra en (2) de acuerdo con la reivindicación 1.

[Reivindicación 3]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la identidad de la secuencia de aminoácido es 85% o más.

[Reivindicación 4]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la identidad de la secuencia de aminoácido es 90% o más.

[Reivindicación 5]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la identidad de la secuencia de aminoácido es 95% o más.

[Reivindicación 6]

5 El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido incluye una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste en (1) a (3),

10 (1) la secuencia de aminoácido en la cual los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 4 se sustituyen, eliminan o añaden, y en la cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y la
15 secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12,

(2) una secuencia de aminoácido en la cual los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5 se sustituyen, eliminan o añaden, y en la cual la secuencia de aminoácido de
20 CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12, y

25 (3) una secuencia de aminoácido en la cual los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 6 se

sustituyen, eliminan o añaden, y en la cual la secuencia de aminoácido de CDR1 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácido de CDR2 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácido de CDR3 es la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

[Reivindicación 7]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 5.

[Reivindicación 8]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 3.

[Reivindicación 9]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el péptido tiene una afinidad por una región extracelular de un receptor de transferrina humana y una región extracelular de un receptor de transferrina de mono

[Reivindicación 10]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 9, en donde una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana y una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina de mono son 5×10^{-11} M a 1×10^{-8} M.

[Reivindicación 11]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 9, en donde ambas constantes de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana son 5×10^{-11} M a 5×10^{-7} M.

[Reivindicación 12]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 9, en donde en un caso en donde un valor de una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana se designa como 1, un valor de una constante de disociación con el receptor de transferrina de mono es 1 a 10.

[Reivindicación 13]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 9, en donde en un caso en donde un valor de una constante de disociación con la región extracelular del receptor de transferrina humana se designa como 1, un valor de una constante de disociación con el receptor de transferrina de mono es 3 a 10.

[Reivindicación 14]

Un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana en el cual una pluralidad del péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, se unen, en donde el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes (1) a (3),

(1) un péptido en el cual 2 a 10 de los péptidos de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 se unen de manera directa o a través de un ligador,

(2) un péptido en el cual 2 o 3 de los péptidos de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 se unen de manera directa o a través de un ligador, y

5 (3) un péptido en el cual 2 de los péptidos de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 se unen de manera directa o a través de un ligador, [Reivindicación 15]

10 El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 14, en donde cada uno de los ligadores enlazan una pluralidad de los péptidos de afinidad con receptor de transferrina humana entre sí es un ligador peptídico que consiste en 1 a 60 aminoácidos.

[Reivindicación 16]

15 El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la
20 secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y una de las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, y SEQ ID NO: 25.

[Reivindicación 17]

25 El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la secuencia de aminoácido

del ligador peptídico consiste en la secuencia de aminoácido en la cual 2 a 10 secuencias de aminoácido cada una se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21 se configuran en serie.

[Reivindicación 18]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido incluye la secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6.

[Reivindicación 19]

Un péptido de afinidad con receptor de transferrina humana, el cual incluye la secuencia de aminoácido en la cual 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácido seleccionados a partir del grupo que consiste en las secuencias establecidas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6 se sustituyen, eliminan o añaden.

[Reivindicación 20]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el número de aminoácidos sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 5.

[Reivindicación 21]

El péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el número de aminoácidos

sustituidos, eliminados o añadidos es 1 a 3.

[Reivindicación 22]

un complejo de reivindicación péptido de afinidad con receptor de transferrina humana, en el cual un fármaco se une al péptido de
5 afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.

[Reivindicación 23]

El complejo de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el fármaco es cualquiera de los siguientes: una proteína (A) diferente, un
10 ácido nucleico, o un compuesto de bajo peso molecular.

[Reivindicación 24]

Una proteína de fusión del péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, y una proteína (A) diferente.

15 [Reivindicación 25]

La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana se une de manera directa o a través del ligador a la terminal C de la proteína (A) diferente.

20 [Reivindicación 26]

La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana se une de manera directa o a través del ligador a la terminal N de la proteína (A) diferente.

25 [Reivindicación 27]

La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 25 o 26,

en donde el ligador que enlaza el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana con la proteína (A) diferente es un ligador peptídico que consiste en 1 a 60 aminoácidos.

[Reivindicación 28]

5 La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico que enlaza el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana a la proteína (A) diferente se selecciona a partir del grupo que consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser,
10 la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y una de las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, y SEQ ID NO: 25.

[Reivindicación 29]

15 La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la secuencia de aminoácido del ligador peptídico que enlaza el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana a la proteína (A) diferente consiste en la secuencia de aminoácido en la cual 2 a 10 secuencias de aminoácido se selecciona cada uno a partir del grupo que
20 consiste en un aminoácido, la secuencia de aminoácido Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Ser-ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Ser, la secuencia de aminoácido Gly-Gly-Gly, y las secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21 se configuran en serie.

25 [Reivindicación 30]

La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 24 a 29, en donde la proteína (A) diferente es una proteína derivada a partir de un humano.

[Reivindicación 31]

5 La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en donde la proteína (A) diferente es una citocina, un factor de crecimiento o un fármaco de anticuerpo.

[Reivindicación 32]

10 La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en donde la proteína (A) diferente se selecciona a partir del grupo que consiste en un factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro un factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una enzima lisosomal, un factor neurotrófico ciliar (CNTF), un factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), una neurotrofina 3, una
15 neurotrofina 4/5, una neurotrofina 6, una neuregulina 1, una eritropoyetina, una darbepoetina, una activina, un factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), un factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un interferón α , un interferón β ,
20 un interferón γ , una interleucina 6, un factor estimulante de colonias de granulocitos y 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 de PD-1, una PD-L1, una PD-L2, una
25 enzima con actividad de degradación de β -amiloide, un anticuerpo anti- β -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.

[Reivindicación 33]

5 La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en donde la proteína (A) diferente es una enzima lisosomal, y

10 en donde la enzima lisosomal, y la enzima lisosomal se selecciona a partir del grupo que consiste en α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, α -glucosidasa ácida, glucocerebrosidasa, β -galactosidasa, proteína activadora de GM2, β -hexosaminidasa A, β -hexosaminidasa B, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, α -manosidasa, β -manosidasa, galactosilceramidasa, saposina C, arilsulfatasa A, α -L-fucosidasa, aspartilglucosaminidasa, α -N-acetilgalactosaminidasa, esfingomielinasa
15 ácida, α -galactosidasa A, β -glucuronidasa, heparán N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA α -glucosaminida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, ceramidasa ácida, amilo-1,6-glucosidasa, sialidasa, tioesterasa de proteína palmitoilada-1, tripeptidil
20 peptidasa-1, hialuronidasa-1, CLN1 y CLN2.

[Reivindicación 34]

La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 33, en donde la seroalbúmina se une con la proteína de fusión.

[Reivindicación 35]

25 La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 33, en donde una región de Fc de IgG humana se

une con la proteína de fusión.

[Reivindicación 36]

Un ácido nucleico que codifica el péptido de afinidad con receptor de transferrina humana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.

[Reivindicación 37]

Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 35.

[Reivindicación 38]

Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 36 o 37.

[Reivindicación 39]

Una célula transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 38.

[Reivindicación 40]

La célula de acuerdo con la reivindicación 39, en donde la célula se deriva a partir de un mamífero.

RESUMEN

Se proporciona un péptido que tiene una afinidad para el receptor de transferrina humana, el cual puede utilizarse para unirse con cualquiera de los compuestos (una proteína, ácido nucleico, compuesto con bajo peso molecular, y entre otros) que necesita mostrar su función en un sistema nervioso central (SNC) y al cual se le permite pasar a través de una barrera hematoencefálica, y un uso del mismo. El péptido es un péptido que incluye, por ejemplo, una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste en secuencias de aminoácido establecidas en SEQ ID NO: 4 a 6, o una variante de las mismas.