

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202491691** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.09.09**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.12.30**

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

**(54) ПРОНИКАЮЩИЙ ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР СЛИТЫЙ БЕЛОК И ВАРИАНТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **10-2021-0194319; 10-2022-0189752**

(32) **2021.12.31; 2022.12.29**

(33) **KR**

(86) **PCT/KR2022/021730**

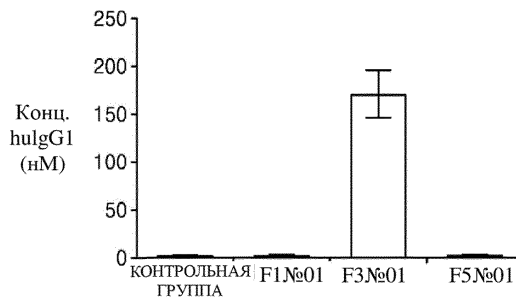
(87) **WO 2023/128702 2023.07.06**

(71) Заявитель:  
**ИМНЬЮРАН, ИНК. (KR)**

(72) Изобретатель:  
**Ким Хан Чжу, Ли Ын А, Ан Ён Иль  
(KR)**

(74) Представитель:  
**Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к проникающему через гематоэнцефалический барьер слитому белку и вариантам его применения, а также предусматривает проникающий через гематоэнцефалический барьер слитый белок, полинуклеотид, кодирующий слитый белок, вектор, включающий в себя полинуклеотид, клеточную линию трансфекции, трансфицированную вектором, а также фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения заболеваний, связанных с дисфункцией головного мозга, включающую слитый белок в качестве активного ингредиента.



**A1**

**202491691**

**202491691**

**A1**

## ПРОНИКАЮЩИЙ ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР СЛИТЫЙ БЕЛОК И ВАРИАНТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к проникающему через гематоэнцефалический барьер слитому белку и вариантам его применения, а также относится к слитому белку, включающему антитело IgG и фрагмент связывания со спиральной областью рецептора трансферрина, связанный с концами антитела IgG, и к медицинскому применению слитого белка. Настоящая заявка основана и претендует на приоритет заявок на патент Кореи №№ 10-2021-0194319, поданной 31 декабря 2021 г., и 10-2022-0189752, поданной 29 декабря 2022 г. в Ведомство интеллектуальной собственности Кореи, раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Предпосылки изобретения

Гематоэнцефалический барьер (ВВВ) представляет собой барьер кровеносных сосудов, который разделяет головной мозг и кровь и служит для изоляции центральной нервной системы, включая головной мозг, от потенциально опасных веществ в крови. ВВВ представляет собой цереброваскулярно-центрированную структуру, состоящую из эндотелиальных клеток головного мозга, астроцитов, перицитов и т. д., и распределяется по кровеносным сосудам головного мозга в пределах ткани головного мозга. Эндотелиальные клетки головного мозга в ВВВ прочно связаны между собой плотными контактами, а астроциты и синаптические нервные окончания астроцитов окружают периферию кровеносных сосудов, образуя барьер, который избирательно препятствует проникновению веществ, текущих с кровью внутри кровеносных сосудов головного мозга, через барьер головного мозга и абсорбции/доставке в ткани головного мозга. Такая барьерная структура обеспечивает избирательное проникновение веществ или препятствует проникновению в зависимости от типа и размера веществ. В случае воды и кислорода, которые необходимы для поддержания жизни, эти вещества могут проникать через ВВВ путем диффузии, а в случае использования аминокислот или глюкозы в качестве источников энергии эти вещества могут доставляться из крови в ткань головного мозга путем активного транспорта. Однако в случае токсичных веществ, которые потенциально могут поражать головной мозг, и болезнетворных микроорганизмов и т. д., транспорт этих веществ тормозится ВВВ, и даже если они проникают через ВВВ, они возвращаются в кровь посредством насосного действия клеток, за счет чего предотвращается их абсорбция в ткань головного мозга. В этом отношении ВВВ служит для защиты ткани головного мозга.

Однако ВВВ с такой структурой выступает основным препятствием при фармакологическом лечении заболеваний, ассоциированных с дисфункцией головного

мозга, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рак головного мозга и т. д. Фактически сообщалось, что лишь немногие терапевтические лекарственные средства с молекулярной массой от 400 дальтон до 500 дальтон способны проникать через ВВВ, и большинство терапевтических лекарственных средств либо неспособны доставляться в ткань головного мозга посредством ВВВ, либо доставляются в очень небольших количествах. В любом случае терапевтические лекарственные средства не проявляют свою эффективность в таком органе-мишени, как ткань головного мозга. Для решения данных проблем было предложено несколько технологий доставки, включая липидную солюбилизацию лекарственных средств для непосредственного проникновения через клеточную мембрану эндотелиальных клеток, доставку через врожденную систему доставки питательных веществ и доставку на основе антител с использованием рецептор-опосредованного трансцитоза. Однако, поскольку эти технологии действуют не только на головной мозг, но и на другие органы, существуют опасения по поводу побочных эффектов в организме, а также существуют ограничения на клиническое применение из-за сложности определения соответствующей концентрации или содержания из-за различий в эффективности доставки для каждого пациента.

На данном уровне техники проводят различные исследования в отношении улучшения проницаемости ВВВ и селективной доставки в ткань головного мозга (KR 10-2021-0005647), но они еще не завершены.

### Сущность изобретения

#### Техническая задача

Чтобы преодолеть данные ограничения существующего уровня техники, авторы настоящего изобретения разработали слитый белок, содержащий: антитело IgG и тетравалентный фрагмент связывания со спиральной областью рецептора трансферрина на концах антитела IgG. Установлено, что благодаря специфическому профилю экспрессии кластеров рецепторов трансферрина в сосудистой области головного мозга и возникающему в результате специфическому взаимодействию с кластерами в сосудистой области головного мозга обеспечивалось не только улучшение проникновения слитого белка через гематоэнцефалический барьер и улучшение эффективности его доставки в ткань головного мозга, но также обеспечивалось селективное, на высоком уровне распределение антител IgG в ткани головного мозга по сравнению с другими тканями, тем самым завершая настоящее изобретение.

Соответственно, в одном аспекте предусмотрен проникающий через гематоэнцефалический барьер слитый белок, при этом слитый белок включает: антитело IgG и тетравалентный фрагмент связывания со спиральной областью рецептора

трансферрина (TfR), связанный с С-концевой областью легкой цепи и С-концевой областью тяжелой цепи антитела IgG.

В другом аспекте предусмотрен полинуклеотид, кодирующий слитый белок, вектор, включающий полинуклеотид, и клеточная линия трансфекции, трансфицированная вектором.

В другом аспекте предусмотрена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения заболеваний, ассоциированных с дисфункцией головного мозга, при этом фармацевтическая композиция включает слитый белок в качестве активного ингредиента.

Другие цели и преимущества настоящей заявки станут более очевидными из следующего подробного описания, формулы изобретения и графических материалов. Содержимое, не описанное в настоящем изобретении, будет в достаточной степени распознано и выведено специалистами в области техники, к которой относится настоящая заявка, или в аналогичной области техники, и, таким образом, описания такого содержимого будут опущены.

#### Техническое решение

В одном аспекте предусмотрен проникающий через гематоэнцефалический барьер слитый белок, при этом слитый белок включает: антитело IgG и тетравалентный фрагмент связывания со спиральной областью рецептора трансферрина (TfR), связанный с С-концевой областью легкой цепи и С-концевой областью тяжелой цепи антитела IgG.

#### Гематоэнцефалический барьер (BBB)

Термин "гематоэнцефалический барьер (BBB)", используемый в настоящем изобретении, относится к структуре, сосредоточенной в сосудах головного мозга, при этом структура обеспечивает селективное поглощение веществ, таких как аминокислоты, глюкоза и т. д., необходимых для поддержания жизни, и в то же время строгий контроль перемещения таких веществ, как ионы, молекулы и болезнетворные микроорганизмы, присутствующих в крови в ткани головного мозга. BBB состоит из таких клеток, как эндотелиальные клетки BBB, астроциты, перициты и т. д. Данные клетки устроены таким образом, что они имеют общую базальную мембрану, и плотно связанные эндотелиальные клетки размещаются по одну сторону BBB, а астроциты, окружающие периваскулярные области, размещаются по другую сторону BBB. Эндотелиальные клетки BBB составляют стенки капилляров и соединены очень прочными и сложными плотными контактами. Такая структура образует физический барьер и служит для подавления простой диффузии большинства веществ, при этом большинство веществ предусматривает молекулы среднего размера, такие как инсулин, до молекул большого размера. Кроме того, астроциты представляют собой тип глиальных клеток центральной нервной системы, которые взаимодействуют с сосудами

головного мозга, влияя на функцию эндотелиальных клеток, кровотока и ионный баланс в головном мозге. Астроциты используют отростки, называемые синаптическими нервными окончаниями, чтобы окружить кровеносные сосуды на одном конце и вступить в тесный контакт с нейронами в синапсе на другом конце. BBB с такой структурой является серьезным препятствием в фармакологическом лечении, поскольку он не только защищает ткань головного мозга от потенциально опасных веществ в крови, но и нарушает доставку в ткань головного мозга веществ, эффективных при лечении заболеваний. Следовательно, технологии, улучшающие проникновение через BBB, могут улучшить применимость или эффективность терапевтических средств в области медицины целенаправленного воздействия на ткань головного мозга.

### Антитело IgG

Термин "антитело IgG", используемый в настоящем изобретении, представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая проявляет иммунологическую реакционную способность в отношении специфического антигена, и относится к белковой молекуле, которая специфически распознает антиген и служит рецептором для антигена. Антитело имеет тяжелую цепь и легкую цепь, где каждая из тяжелой цепи и легкой цепи предусматривает константную область и переменный домен. Переменный домен каждой из легкой цепи и тяжелой цепи предусматривает три переменных домена, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), и четыре каркасные области. CDR главным образом функционирует для связывания с эпитопом антигена. CDR каждой цепи обычно называются CDR1, CDR2 и CDR3 последовательно, начиная с N-конца, а также идентифицируются по цепи, на которой расположена конкретная CDR. Антитело может включать все из поликлонального антитела, моноклонального антитела, полноразмерного антитела и фрагмента антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающего антигенсвязывающий домен. Полноразмерное антитело имеет структуру с двумя полноразмерными легкими цепями и двумя полноразмерными тяжелыми цепями, где каждая легкая цепь соединена с тяжелой цепью посредством дисульфидной связи. Полноразмерное антитело предпочтительно может представлять собой IgG, и его подтипы могут включать IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Кроме того, антитело может представлять собой природное антитело или рекомбинантное антитело. Термин "природное антитело" относится к антителу, которое не было генетически модифицировано, и в этом отношении риск иммуногенности, которой генетически модифицированное антитело может обладать *in vivo*, может быть значительно ниже. Выражение "рекомбинантное антитело" относится к антителу, которое было генетически модифицировано, и в этом отношении рекомбинантное антитело может

обладать способностью придавать антигенсвязывающую силу или необходимые характеристики посредством генетической модификации.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" или "фрагмент антитела", используемый в настоящем изобретении, относится к фрагменту, который сохраняет функцию связывания с антигеном, и может включать такие функциональные фрагменты антитела, как Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv, одноцепочечный Fv (scFv) и двухвалентная молекула scFv-Fc, или их комбинацию. Также, например, антигенсвязывающий фрагмент может включать следующее, но без ограничения ими, и структуры IgG-подобных биспецифических антител, известные в данной области, могут быть использованы без ограничения: (1) Fab, который представляет собой фрагмент, который включает моновалентный антигенсвязывающий фрагмент молекулы антитела и может быть получен путем расщепления целого антитела ферментом папаином с получением частей из необработанной легкой цепи и одной тяжелой цепи; (2) Fab', который представляет собой фрагмент молекулы антитела, который может быть получен при обработке целого антитела пепсином с последующим восстановлением с получением частей из необработанных легких цепей и тяжелых цепей; на молекулу антитела получают два Fab'-фрагмента; (3) (Fab')<sub>2</sub>, который представляет собой фрагмент антитела, который может быть получен при обработке целого антитела ферментом пепсином без последующего восстановления и представляет собой димер двух Fab'-фрагментов, связанных между собой двумя дисульфидными связями; (4) Fv, который представляет собой генетически модифицированный фрагмент, включающий переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые экспрессируются в виде двух цепей; (5) одноцепочечное антитело (SCA или scFv), которое представляет собой генетически слитую одноцепочечную молекулу, включающую переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связаны подходящим полипептидным линкером; (6) scFv-Fc, который представляет собой молекулу, полученную путем слияния одноцепочечного Fv (scFv) с шарнирной областью иммуноглобулинов (Ig), таких как IgG, и Fc-области.

Кроме того, антитело или фрагмент антитела представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая сохраняет функцию связывания с антигеном, и может включать моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, мышинное антитело, химерное антитело, scFv, одноцепочечное антитело, Fab-фрагмент, F(ab')-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>, дисульфид-связанные Fv (sdFv), scFv-фрагмент, scFv-Fc-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело, триатело, тетраатело и т. д. Fab среди фрагментов антитела имеет структуру с переменными доменами легкой и тяжелой цепей, константной областью легкой цепи и первой константной областью

тяжелой цепи (CH1) и имеет один антигенсвязывающий сайт. Fab' отличается от Fab тем, что он имеет шарнирную область, включающую один или несколько остатков цистеина, на С-конце домена CH1 тяжелой цепи. Антитело F(ab')<sub>2</sub> получают путем образования дисульфидных связей между остатками цистеина в шарнирной области Fab'. Fv представляет собой наименьший фрагмент антитела, включающий только переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи. Двухцепочечный Fv (двухцепочечный Fv) состоит из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, соединенных нековалентной связью. Данные фрагменты антител можно получать с использованием протеолитических ферментов (например, Fab можно получать путем расщепления целого антитела папаином, а F(ab')<sub>2</sub> можно получать путем расщепления пепсином) или также можно получать с помощью технологий генетической рекомбинации.

В настоящем изобретении антитело IgG представляет собой объект, который образует слияние с фрагментом связывания со спиральной областью рецептора трансферрина, и в этом отношении каждый из С-конца легкой цепи и С-конца тяжелой цепи, входящих в состав антитела IgG, может быть связан или конъюгирован с фрагментом связывания со спиральной областью рецептора трансферрина. Антитело IgG может обладать повышенной способностью селективно проникать через BBB и может распределяться на относительно высоком уровне в ткани головного мозга по сравнению с другими органами и клетками.

В одном из вариантов осуществления антитело IgG может представлять собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, способные связываться с антигеном-мишенью, известным в уровне техники, применимым для лечения, облегчения или выявления заболеваний, ассоциированных с дисфункцией головного мозга. Например, антитело IgG может быть фармацевтически активным ингредиентом для лечения или облегчения заболеваний, ассоциированных с дисфункцией головного мозга. Антитело IgG может представлять собой антитело для лечения или облегчения заболеваний, ассоциированных с дисфункцией головного мозга, таких как болезнь Альцгеймера; деменция с тельцами Леви; лобно-височная деменция; деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков; болезнь Паркинсона; рассеянный склероз; боковой амиотрофический склероз (ALS); травматическое повреждение головного мозга; прогрессирующий супрануклеарный паралич; кортико-базальная дегенерация; глобулярная глиальная таупатия; тау-астроглиопатия, связанная со старением; хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ); рак головного мозга, такой как первичная лимфома ЦНС (PCNSL), глиома, нейробластома, метастатическая опухоль головного мозга, менингиома и т. д.; болезнь Пика; таупатия, связанная с антителами к IgLON5; гваделупский паркинсонизм;

кивательный синдром; боль; эпилепсия; аутизм; инсульт; синдром Гийена-Барре (GBS); болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD); болезнь Хантингтона; прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия (PML); депрессия; посттравматическое стрессовое расстройство (PTSD) и лизосомальная болезнь накопления (LSD). Например, антитело IgG может представлять собой без ограничения антитело IgG к  $\alpha$ PD-L1, антитело IgG к PD1, антитело IgG к Тау, антитело IgG к HER2, антитело IgG к A $\beta$ , антитело IgG к TDP-43, антитело IgG к альфа-синуклеину, антитело IgG к SIGLEC3 или антитело IgG к TREM2.

#### Рецептор трансферрина (TfR)

Термин "рецептор трансферрина (TfR)", используемый в настоящем изобретении, относится к мембранному гликопротеину, экспрессируемому на поверхности клеток, который опосредует внутриклеточное поглощение железа из трансферрина, представляющего собой гликопротеин плазмы крови. TfR широко распространены в нормальных клетках различных тканей и, как сообщается, экспрессируются в больших количествах на активированных иммунных клетках и опухолевых клетках. Следовательно, технологии доставки, опосредованные TfR, требуют не только эффективной доставки в ткань головного мозга, но и низкой доставки в органы, отличные от ткани головного мозга, и в нормальные клетки. Фактически, сообщалось, что TfR-опосредованные носители или терапевтические средства вызывают случаи токсичности, связанные с эритроцитами, включая снижение количества ретикулоцитов, тяжелую кому, перемежающуюся скованность конечностей, общую скованность, гемолиз и гемоглобинурию. Кроме того, внеклеточный домен (эктодомен) TfR разделен на апикальный домен, спиральный домен и протеазоподобный домен, и известно, что они имеют различные значения аффинности связывания с веществами-мишенями во время рецептор-опосредованного трансцитоза.

Генетическая информация о TfR может быть получена из известных баз данных, таких как GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Например, TfR может состоять из без ограничения аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1.

#### Кластер рецепторов трансферрина (TfR)

Термин "кластер рецепторов трансферрина (TfR)", используемый в настоящем изобретении, относится к кластеру, в котором множество TfR присутствуют с высокой плотностью в локализованной области, при этом кластер рецепторов трансферрина может размещаться в клетках или тканях, таких как кровеносные сосуды, в виде агрегации множества рецепторов трансферрина. В частности, в отличие от кластеров TfR, размещающихся в тканях или клетках других органов, кластеры TfR, присутствующие в сосудистой области головного мозга, могут иметь специфический профиль экспрессии. В



частности, термин "специфический профиль экспрессии" относится к значительно более плотному размещению TfR в пределах локализованной области, где образуются кластеры, по сравнению с профилями в других органах или клетках. Данные специфичные для ткани головного мозга кластеры и профиль экспрессии TfR в пределах кластера могут тесно коррелировать с высокой проницаемостью BBB и селективной доставкой в ткань головного мозга.

Фрагмент связывания со спиральной областью TfR

Термин "фрагмент связывания со спиральной областью TfR", используемый в настоящем изобретении, относится к функциональной единице, которая взаимодействует с рецептором, присутствующим на поверхности клеток, составляющих BBB, и, в частности, может относиться к фрагменту, который обладает эффективной аффинностью связывания в отношении спиральной области среди областей, составляющих TfR. Фрагмент связывания со спиральной областью TfR может находиться в тетравалентной форме, что отражает профиль экспрессии кластеров TfR, специфичный в кровеносных сосудах ткани головного мозга. В данном случае спиральная область TfR представляет собой функциональную/структурную область, открытую снаружи, так что между слитыми белками и множеством TfR, распределенных с высокой плотностью в кластере в кровеносных сосудах ткани головного мозга, образуются сильные тетравалентные связи, и это может способствовать высокой проницаемости BBB и селективной доставке в ткань головного мозга. Таким образом, фрагмент связывания, способный связываться со спиральной областью TfR, связан с антителом IgG, тем самым не только значительно улучшая проницаемость BBB для антитела IgG, но также придавая функциональность обеспечения селективной доставки/захвата антитела IgG в ткани головного мозга.

Фрагмент связывания предназначен для взаимодействия с кластерами TfR, расположенными в сосудистых областях ткани головного мозга, с образованием комплекса/слияния, и может обладать аффинностью связывания с множеством TfR в пределах локализованной области, где образуются кластеры TfR. Подробно, фрагмент связывания может обладать аффинностью связывания со спиральной областью TfR, в частности, с по меньшей мере одной аминокислотой, выбранной из области от 606<sup>й</sup> аминокислоты до 665<sup>й</sup> аминокислоты на основе TfR с SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления фрагмент связывания со спиральной областью TfR может быть связан с С-концом легкой цепи и С-концом тяжелой цепи антитела IgG, и в этом отношении фрагмент связывания со спиральной областью TfR может быть связан с антителом IgG в тетравалентной форме, проявляя тем самым предполагаемые функции.



10 аминокислот до 40 аминокислот, от 10 аминокислот до 36 аминокислот, от 10 аминокислот до 32 аминокислот, от 10 аминокислот до 28 аминокислот, от 10 аминокислот до 24 аминокислот, от 10 аминокислот до 20 аминокислот, от 10 аминокислот до 16 аминокислот, от 10 аминокислот до 12 аминокислот, от 12 аминокислот до 48 аминокислот, от 12 аминокислот до 44 аминокислот, от 12 аминокислот до 40 аминокислот, от 12 аминокислот до 36 аминокислот, от 12 аминокислот до 32 аминокислот, от 12 аминокислот до 28 аминокислот, от 12 аминокислот до 24 аминокислот, от 12 аминокислот до 20 аминокислот, от 12 аминокислот до 16 аминокислот, от 14 аминокислот до 48 аминокислот, от 14 аминокислот до 44 аминокислот, от 14 аминокислот до 40 аминокислот, от 14 аминокислот до 36 аминокислот, от 14 аминокислот до 32 аминокислот, от 14 аминокислот до 28 аминокислот, от 14 аминокислот до 24 аминокислот, от 14 аминокислот до 20 аминокислот или от 14 аминокислот до 16 аминокислот, но длина этим не ограничена.

В одном варианте осуществления фрагмент связывания со спиральной областью TfR может включать аминокислотную последовательность, в которой последовательность мономерной единицы повторяется от 2 раз до 5 раз, от 2 раз до 4 раз или от 2 раз до 3 раз. Последовательности мономерных единиц могут быть соединены вместе путем слияния или посредством линкерных пептидов. Длина линкерного пептида может составлять от 2 аминокислот до 50 аминокислот. Например, длина линкерного пептида может составлять от 2 аминокислот до 40 аминокислот, от 2 аминокислот до 30 аминокислот, от 2 аминокислот до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 2 аминокислот до 10 аминокислот, от 2 аминокислот до 5 аминокислот, от 5 аминокислот до 50 аминокислот, от 5 аминокислот до 40 аминокислот, от 5 аминокислот до 30 аминокислот, от 5 аминокислот до 20 аминокислот, от 5 аминокислот до 15 аминокислот или от 5 аминокислот до 10 аминокислот, но длина этим не ограничена. Также линкерный пептид может представлять собой, например,  $(G_1S_m)_n$  (где  $l$  может составлять от 2 до 8,  $m$  может составлять от 1 до 5, и  $n$  может составлять от 1 до 5),  $(G_dS_eAS)_f$  (где  $d$  может составлять от 2 до 8,  $e$  может составлять от 1 до 5, и  $f$  может составлять от 1 до 5),  $(G_4S)_a(EAAAK)_b(G_4S)_a$  (где  $a$  и  $b$  могут быть целыми числами от 1 до 4) или  $[(G_4S)_p(EAAAK)_q]_r$  (где каждый из  $p$  и  $q$  может быть целым числом от 1 до 4), но без ограничения этим.

В одном варианте осуществления последовательность мономерной единицы, входящая в состав фрагмента связывания со спиральной областью TfR, может включать проникающий в клетки пептид. Последовательность мономерной единицы может представлять собой, например, любую из SEQ ID NO: 3-43, но может быть продлена

неограничивающим образом при условии, что имеется сильное взаимодействие (водородная связь, электростатическое притяжение, сила Ван-дер-Ваальса), т. е. сильная аффинность связывания, со спиральной областью TfR.

В одном из вариантов осуществления каждый из множества фрагментов связывания со спиральной областью TfR может быть идентичным или отличаться друг от друга.

*Проникающий через гематоэнцефалический барьер (BBB) слитый белок*

Термин "слитый белок", используемый в настоящем изобретении, относится к белку, образованному посредством комбинации двух или более изначально различных белков или их частей, и может необязательно включать линкер или спейсер, расположенный между двумя или более белками. Термин "проникающий через BBB слитый белок", используемый в настоящем изобретении, представляет собой белок, образующийся посредством связывания антитела IgG и фрагмента связывания со спиральной областью TfR, и может относиться к общему термину для белков, имеющих функциональные структуры, которые обеспечивают селективную доставку или захват эффективного количества антител IgG путем проникновения в BBB. Термин "функциональная структура" относится к структуре, модифицированной для обеспечения эффективной аффинности связывания путем отражения структуры и профиля экспрессии кластеров TfR сосудистых эндотелиальных клеток, которые специфически распределены в BBB, и может включать фрагмент связывания со спиральной областью TfR и тетравалентную связь (соединение) между фрагментом связывания и С-концевыми областями тяжелой и легкой цепей, входящих в состав антитела IgG.

В одном варианте осуществления проникающий через BBB слитый белок может иметь функциональную структуру, в которой тетравалентный фрагмент связывания со спиральной областью связан с С-концевыми областями легкой цепи и С-концевыми областями тяжелой цепи антитела IgG.

В одном варианте осуществления в антителе IgG связь между фрагментом связывания спиральной области и С-концевыми областями легкой цепи, а также связь между фрагментом связывания спиральной области и С-концевыми областями тяжелой цепи может быть достигнута путем слияния с концевыми областями антитела IgG или может быть достигнута с помощью линкерных пептидов. В данном случае линкерные пептиды являются такими же, как описанные выше.

В одном из вариантов осуществления проникающий через BBB слитый белок может образовывать комплекс путем связывания с TfR, который образует кластеры TfR, специфически распределенные в кровеносных сосудах BBB. Например, проникающий через BBB слитый белок может связываться с множеством TfR, которые с высокой

плотностью распределены в пределах кластеров TfR, а не с тканями или клетками других органов.

Согласно варианту осуществления функциональная структура разработана так, чтобы отражать эффективную аффинность связывания со спиральной областью TfR и специфический профиль распределения/экспрессии кластеров TfR, расположенных в цереброваскулярных доменах, и в этом отношении получают слитый белок, в котором множество фрагментов связывания со спиральной областью TfR связаны с С-концами легкой и тяжелой цепей, т. е. в общей сложности с четырьмя концевыми областями антитела IgG. Впоследствии, когда средство, включающее слитый белок, вводят внутривенно, не только значительно усиливается доставка слитого белка, предусматривающего антитело IgG, в ткань головного мозга, но также антитело IgG распределяется на более высоком уровне в ткани головного мозга, чем в других органах. В частности, было подтверждено, что воздействие слитого белка на нормальные клетки, включая ретикулоциты и ткани других органов, минимально. Кроме того, что касается функции, полученной на основе тетравалентного фрагмента с сильной аффинностью связывания со спиральной областью TfR, и функциональной структуры, включающей тетравалентный фрагмент, было подтверждено, что слитый белок проявляет такие эффекты, как высокое проникновение через BBB, независимо от типов антитела IgG и специфических последовательностей фрагмента связывания. Таким образом, в одном варианте осуществления недавно идентифицирована функциональная структура, которая связана с фрагментом связывания, повышает проникновение антитела IgG через BBB и одновременно индуцирует селективную доставку антитела IgG в ткани головного мозга, а также способна внести свой вклад в снижение побочных эффектов лекарственных средств на основе антител.

В одном из вариантов осуществления проникающий через BBB слитый белок может предусматривать: первый фрагмент связывания, связанный с С-концевой областью легкой цепи антитела IgG; и второй фрагмент связывания, связанный с С-концевой областью тяжелой цепи антитела IgG.

В одном из вариантов осуществления проникающий через BBB слитый белок может быть составлен для введения, и введение может осуществляться любым неограничивающим способом введения обычного слитого белка или средства на основе антитела. Например, введение может представлять собой внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутрибрюшинное введение, глазное введение, интратекальное введение, интрацеребровентрикулярное введение, интраназальное введение и т.д. При таких условиях введения слитый белок может обеспечивать доставку/распределение антитела IgG в качестве партнера по слиянию на

высоких уровнях в ткани головного мозга посредством соответствующего уровня взаимодействия с некоторыми областями рецепторов, присутствующих на поверхности клеток, входящих в состав BBB, т. е. спиральной областью TfR, или посредством связи с фрагментом связывания со спиральной областью TfR, который может обеспечить аффинность связывания.

В другом аспекте предусмотрен полинуклеотид, кодирующий слитый белок, вектор, включающий полинуклеотид, и клеточная линия трансфекции, трансфицированная вектором.

Среди терминов или элементов, упомянутых в связи со следующими полинуклеотидом, вектором или клеточной линией трансфекции, те, которые уже были упомянуты в описании слитого белка, проникающего через BBB, являются такими же, как описанные выше.

#### Полинуклеотиды, кодирующие слитый белок

Полинуклеотид может быть в форме РНК или ДНК, и ДНК может предусматривать cDNA и синтетическую ДНК. ДНК может быть однонитевой или двухнитевой. В случае одной нити она может быть кодирующей нитью или не кодирующей (антисмысловой) нитью, а кодирующая последовательность может в результате вырожденности или избыточности генетического кода кодировать один и тот же полипептид.

Полинуклеотид также может включать вариант полинуклеотида, описанный в данном документе, где вариант полинуклеотида может представлять собой встречающийся в природе аллельный вариант полинуклеотида или вариант полинуклеотида, не встречающийся в природе. Аллельный вариант может представлять собой альтернативную форму полинуклеотидной последовательности, которая может содержать замену, делецию или добавление одного или нескольких нуклеотидов без существенного изменения функции кодируемого полинуклеотида. В уровне техники хорошо известно, что одна аминокислота может кодироваться одним или несколькими нуклеотидными кодонами и что полинуклеотид можно легко модифицировать с получением альтернативного полинуклеотида, кодирующего тот же пептид.

#### Вектор, предусматривающий полинуклеотид

Термин "вектор", используемый в настоящем описании, представляет собой переносчик на основе ДНК, который обеспечивает экспрессию белка-мишени в подходящей клетке-хозяине, а также относится к генетической конструкции, включающей регуляторные элементы, функционально связанные для экспрессии генной вставки. Вектор в соответствии с вариантом осуществления может предусматривать факторы регуляции экспрессии, такие как промотор, оператор, иницирующий кодон, стоп-кодон, сигнал полиаденилирования и/или энхансер, и промотор вектора может быть конститутивным или

индуцируемым. Кроме того, вектор может представлять собой вектор экспрессии, способный стабильно экспрессировать слитый белок в клетке-хозяине. В качестве вектора экспрессии можно использовать обычный вектор для данной области, используемый для экспрессии чужеродного белка в растениях, животных или микроорганизмах. Рекомбинантный вектор можно сконструировать различными способами, известными в уровне техники. Например, вектор может предусматривать селективируемый маркер для отбора клетки-хозяина, включающей вектор, а в случае реплицируемого вектора он может предусматривать точку начала репликации. Кроме того, вектор может быть самореплицируемым или введен в ДНК хозяина, при этом вектор может быть выбран из группы, состоящей из плазмиды, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса, ретровируса, вируса простого герпеса и вируса осповакцины.

В одном варианте осуществления вектор может предусматривать промотор, функционирующий в клетках животных, предпочтительно в клетках млекопитающих. Подходящий промотор в соответствии с вариантом осуществления может предусматривать промоторы, полученные из вирусов млекопитающих, и промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих, и их примеры могут включать промотор цитомегаловируса (CMV), промотор T7, промотор U6, промотор H1, промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса лейкоза мышей (MLV), ранний промотор аденовируса, поздний промотор аденовируса, промотор 7,5K вируса осповакцины, промотор SV40, промотор tk из HSV, промотор RSV, промотор гена EF-1альфа, промотор гена металлотioneина, промотор гена бета-актина, промотор гена IL-2 человека, промотор гена IFN человека, промотор гена IL-4 человека, промотор гена лимфотоксина человека, промотор гена GM-CSF человека, промотор гена фосфоглицераткиназы (PGK) человека, промотор гена PGK мыши, промотор выживаемости и промотор гена фактора элонгации-1 $\alpha$  (CHEF1- $\alpha$ ) китайского хомячка.

Кроме того, в векторе полинуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, проникающий через ВВВ, может быть функционально связана с промотором. Термин "функционально связанный", используемый в настоящем изобретении, относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью для контроля экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты (например, промотором, сигнальной последовательностью или матрицей сайтов связывания регулятора транскрипции) и другой последовательностью нуклеиновой кислоты. В этом отношении регуляторная последовательность может регулировать транскрипцию и/или трансляцию другой последовательности нуклеиновой кислоты.

#### Клеточная линия трансфекции

Термин "трансфекция", используемый в настоящем изобретении, относится к технологии молекулярной биологии, в которой фрагмент цепи ДНК или плазида, имеющая чужеродные гены, отличные от таковых в исходной клетке, проникает в клетки и связывается с ДНК, существующей в исходной клетке, тем самым трансформируя генетические признаки исходной клетки. Трансфекция относится к получению слитого белка, проникающего через ВВВ, путем встраивания полинуклеотида, кодирующего слитый белок, проникающий через ВВВ, или вектора, включающего данный полинуклеотид, в клетку-хозяина.

Клеточная линия трансфекции или клетка-хозяин предпочтительно может быть любой, выбранной из группы, состоящей из: микроорганизмов, в том числе прокариот, таких как бактерии, и эукариот, таких как дрожжи; клеток, полученных от насекомых, таких как клетки Sf9; клеток, полученных от мышей, таких как клетки СНО; клеток, полученных от человека, таких как НЕК293; и гибридом, продуцирующих антитела, но без ограничения ими.

В другом аспекте предусмотрены: фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга, при этом фармацевтическая композиция включает слитый белок в качестве активного ингредиента; медицинское применение слитого белка для предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга; или способ лечения заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга, при этом способ включает введение субъекту фармацевтической композиции.

Среди терминов или элементов, упомянутых в связи со следующей фармацевтической композицией для предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга, ее медицинским применением или способом лечения заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга, те, которые уже были упомянуты в описании проникающего через ВВВ слитого белка являются такими же, как описанные выше.

*Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга*

Термин "предупреждение", используемый в настоящем изобретении, относится ко всем действиям, которые подавляют или задерживают начало заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга, при введении фармацевтической композиции.

Термин "лечение", используемый в настоящем изобретении, относится ко всем действиям, посредством которых симптомы заболевания, ассоциированного с дисфункцией



головного мозга, улучшаются или благоприятно изменяются при введении фармацевтической композиции.

"Заболевание, ассоциированное с дисфункцией головного мозга", которое представляет собой заболевание, подлежащее предупреждению или лечению с помощью фармацевтической композиции, может включать: болезнь Альцгеймера; деменцию с тельцами Леви; лобно-височную деменцию; деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков; болезнь Паркинсона; рассеянный склероз; боковой амиотрофический склероз; травматическое повреждение головного мозга; прогрессирующий супрануклеарный паралич; кортико-базальную дегенерацию; глобулярную глиальную таупатию; тау-астроглиопатию, связанную со старением; хроническую травматическую энцефалопатию; рак головного мозга, такой как первичная лимфома ЦНС, глиома, нейробластома, метастатическая опухоль головного мозга, менингиома и т. д.; болезнь Пика; таупатию, связанную с антителами к IgLON5; гваделупский паркинсонизм; кивательный синдром; боль; эпилепсию; аутизм; инсульт; синдром Гийена-Барре; болезнь Крейтцфельдта-Якоба; болезнь Хантингтона; прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию; депрессию; посттравматическое стрессовое расстройство и лизосомальную болезнь накопления, но без ограничения ими.

Фармацевтическая композиция, т. е. фармацевтический препарат, включающий слитый белок, может быть получена путем смешивания антитела, имеющего необходимую степень чистоты, с любым фармацевтически приемлемым носителем, вспомогательным веществом или стабилизатором (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированного препарата или водного раствора. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и могут включать буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенольный, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, такие как глюкоза, манноза или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например,

Zn-белковые комплексы) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

Фармацевтическая композиция может дополнительно включать активный ингредиент, т. е. необязательный ингредиент с дополняющими видами активности, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Тип и эффективное количество фармацевтической композиции могут быть, например, определены в зависимости от количества антител, присутствующих в препарате, и клинических параметров субъекта. Активный ингредиент может быть, например, доставлен в форме микрокапсул, таких как гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли (метилметакрилатные) микрокапсулы, при этом активный ингредиент может быть доставлен в коллоидной системе доставки лекарственного средства (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или может быть доставлен в инкапсулированной форме посредством микроэмульсии.

Фармацевтическая композиция может быть составлена, дозирована и введена способом, соответствующим медицинской практике. Факторы, которые следует учитывать в этом отношении, могут включать в себя конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное вскармливающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, участок доставки средства, способ введения, схему введения и другие факторы, известные врачу. Антитело можно, но не обязательно, составить в комбинации с одним или несколькими средствами, используемыми в настоящее время для предупреждения или лечения заболевания. Эффективное количество других средств определяется количеством антител, присутствующих в составе, типом нарушения или лечения и другими факторами. Фармацевтическую композицию обычно можно вводить в тех же дозах и путями введения, которые описаны в данном документе, в количестве от приблизительно 1% до 99% доз, описанных в данном документе, или в любой дозе и любым путем, эмпирически/клинически определенным как подходящий.

#### Способ лечения заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга

В способе лечения заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга, можно применять фармацевтическую композицию отдельно или в комбинации с другими средствами. Например, фармацевтическую композицию можно вводить совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством. Дополнительное терапевтическое средство представляет собой терапевтическое средство, эффективное при лечении заболевания, ассоциированного с дисфункцией головного мозга, и может включать без ограничения следующее: ингибитор холинэстеразы (например, донепезил, галантамин, ривастигмин и такрин), антагонист рецептора NMDA (например, мемантин), ингибитор

агрегации бета-амилоидного пептида, антиоксидант, модулятор  $\gamma$ -секретазы, имитатор фактора роста нервов (NGF) или средство генной терапии на основе NGF, агонист PPAR $\gamma$ , ингибитор HMS-CoA-редуктазы (статины), ампакин, блокатор кальциевых каналов, антагонист рецептора GABA, ингибитор киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонист мускариновых рецепторов, модулятор никотиновых рецепторов, активная или пассивная иммунизация бета-амилоидным пептидом, ингибитор фосфодиэстеразы, антагонист серотониновых рецепторов и антитело к бета-амилоидному пептиду.

Кроме того, для предупреждения или лечения целевого заболевания подходящая доза фармацевтической композиции (при использовании отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами) может быть определена в зависимости от типа заболевания, подлежащего лечению, тяжести и течения заболевания, вводится ли антитело в профилактических или терапевтических целях, в зависимости от ранее проводимой терапии, клинического анамнеза пациента и ответа на антитела, а также решения лечащего врача. Антитело можно соответствующим образом вводить пациенту сразу или в течение серии курсов лечения, и для целей настоящего изобретения антитело может быть предусмотрено в форме слитого белка, связанного с тетравалентным фрагментом связывания со спиральной областью TfR. В зависимости от типа и тяжести заболевания от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг (например, от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг) антитела или слитого белка может быть, например, начальной кандидатной дозой для введения пациенту независимо от того, является ли введение одним или несколькими отдельными введениями или введение осуществляется путем непрерывной инъекции. Типичная суточная доза может находиться в диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг или более в зависимости от вышеупомянутых факторов. При повторном введении в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от патологии, лечение обычно продолжают до тех пор, пока не произойдет необходимое подавление симптомов заболевания. Одна иллюстративная доза антитела или слитого белка может находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг. Соответственно, пациенту можно вводить одну или более доз, составляющих приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг (или любую их комбинацию). Дозу можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, так, что пациенту вводят дозу антитела или слитого белка, составляющую от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, или, например, приблизительно 6 мг/кг). После высокой нагрузочной дозы в начале можно вводить одну или несколько более низких доз.

Термин "субъект", используемый в настоящем изобретении, относится к мишени, нуждающейся в лечении заболевания, и, более конкретно, относится к млекопитающему, в том числе человеку или примату, не являющемуся человеком, как, например, мыши, собаке, кошке, лошади и корове.

#### Полезные эффекты

Что касается проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка в соответствии с одним аспектом, было подтверждено, что когда состав, включающий слитый белок, вводят внутривенно, доставка антител IgG в ткань головного мозга значительно усиливается благодаря сильным взаимодействиям между фрагментами связывания и рецепторами трансферрина.

Кроме того, что касается проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка в соответствии с одним аспектом, было подтверждено, что когда состав, включающий слитый белок, вводят внутривенно, слитый белок демонстрирует хорошую биобезопасность, поскольку он может селективно доставлять антитело IgG на высоком уровне в ткань головного мозга по сравнению с доставкой в другие органы и клетки благодаря специфическому распределению кластеров TfR в сосудистой области ткани головного мозга и сильному взаимодействию с кластерами.

Следовательно, слитый белок в соответствии с одним аспектом можно использовать в качестве активного ингредиента в фармацевтической композиции для области медицины, требующей селективной доставки лекарственного средства в ткань головного мозга, например, для предупреждения или лечения заболеваний, ассоциированных с дисфункцией головного мозга.

#### Описание графических материалов

На фиг. 1 представлено изображение рецептора трансферрина, полученное с помощью криогенной электронной микроскопии, демонстрирующее результаты идентификации спиральной области в рецепторе трансферрина.

На фиг. 2 представлены результаты структурной идентификации связей между фрагментом связывания спиральной области и спиральной областью рецептора трансферрина по данным криогенной электронной микроскопии.

На фиг. 3 показана термодинамическая структурная стабильность связывания между рецептором трансферрина и фрагментом связывания спиральной области №01 в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 4 показаны результаты подтверждения уровней внутриклеточной доставки фрагмента связывания спиральной области №01 в соответствии с вариантом осуществления с использованием линии эндотелиальных клеток головного мозга человека.

На фиг. 5 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 6 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ISF после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 7 показаны результаты визуализации в реальном времени трансцитоза слитого белка в гематоэнцефалическом барьере после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с краниальным окном.

На фиг. 8 показаны результаты подтверждения в реальном времени уровней слитого белка, присутствующего во внутрисосудистой области (ROI 1), стенке кровеносного сосуда (ROI 2) и внесосудистой области (ROI 3) после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с краниальным окном.

На фиг. 9 показаны результаты сравнения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга, количественно выраженных как относительные значения по отношению к контрольной группе, после внутривенного введения проникающих через гематоэнцефалический барьер слитых белков (F1№01, F3№01 и F5№01) в соответствии с вариантом осуществления на животной модели.

На фиг. 10 показано связывание слитых белков с рецептором трансферрина, подтвержденное иммуноокрашиванием после внутривенного введения проникающих через гематоэнцефалический барьер слитых белков (F1№01, F3№01 и F5№01) в соответствии с вариантом осуществления на животной модели, где в (a) на фиг. 10 показаны результаты для слитого белка F5№01, в (b) на фиг. 10 показаны результаты для слитого белка F1№01 и в (c) на фиг. 10 показаны результаты для слитого белка F3№01.

На фиг. 11 показаны результаты сравнения количественных уровней связывания между слитыми белками и рецептором трансферрина после внутривенного введения проникающих через гематоэнцефалический барьер слитых белков (F1№01, F3№01 и F5№01) в соответствии с вариантом осуществления на животной модели.

На фиг. 12 показаны результаты взаимодействия между проникающим через гематоэнцефалический барьер слитым белком F3№01 в соответствии с вариантом

осуществления и рецептором трансферрина, что подтверждено отрицательным окрашиванием в ТЕМ-анализе.

На фиг. 13 показаны результаты визуализации структуры комплекса, образованного связями между проникающим через гематоэнцефалический барьер слитым белком в соответствии с вариантом осуществления и рецептором трансферрина.

На фиг. 14 показаны результаты подтверждения уровней распределения антител IgG1 в каждом органе после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 15 показаны результаты подтверждения уровней распределения антител IgG1 в каждом органе после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 16 показаны результаты подтверждения процентного содержания (%) ретикулоцитов в общем количестве эритроцитов после того, как проникающий через гематоэнцефалический барьер слитый белок F3№01 в соответствии с вариантом осуществления вводили внутривенно на животной модели и получали кровь.

На фиг. 17 показаны результаты подтверждения концентрации слитого белка в плазме крови после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели.

На фиг. 18 показаны результаты расчета соотношения в крови/плазме крови после обработки образцов плазмы крови и крови проникающим через гематоэнцефалический барьер слитым белком F3№01 в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 19 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 20 показаны результаты подтверждения уровней распределения антител IgG1 в каждом органе после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3'№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 21 показаны результаты подтверждения уровней распределения антител IgG1 в каждом органе после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3'№01 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 22 показаны результаты сравнения количеств рецептора трансферрина, экспрессируемого в ткани головного мозга, сосудистых клетках, печени, легком, почке и селезенке, посредством вестерн-блоттинга.

На фиг. 23 показаны результаты подтверждения профиля экспрессии рецептора трансферрина в ткани головного мозга, печени, селезенке, легком и ретикулоцитах с помощью изображений конфокальной микроскопии и изображений конфокальной флуоресцентной микроскопии STED сверхвысокого разрешения.

На фиг. 24 показаны результаты сравнения количественного распределения кластеров рецепторов трансферрина, образующихся в сосудах головного мозга, ретикулоцитах, легком, печени и селезенке, в зависимости от размера кластера.

На фиг. 25 показаны результаты сравнения средних значений интенсивности всех кластеров рецепторов трансферрина в сосудах головного мозга и ретикулоцитах.

На фиг. 26 представлена диаграмма, на которой схематически показано в качестве параметров для расчета расстояния между рецепторами трансферрина минимальное значение (мин.) и максимальное значение (макс.) расстояния между рецепторами трансферрина.

На фиг. 27 показаны результаты сравнения плотности общего количества рецепторов трансферрина в сосудах головного мозга и ретикулоцитах.

На фиг. 28 показаны результаты сравнения расстояния между рецепторами трансферрина в сосудах головного мозга и ретикулоцитах.

На фиг. 29 показаны результаты подтверждения термодинамической структурной стабильности связей между рецептором трансферрина и фрагментом связывания спиральной области №2, №3, №5, №6, №7 или №8 в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 30 показаны результаты подтверждения термодинамической структурной стабильности связей между рецептором трансферрина и фрагментом связывания спиральной области №9, №10, №11, №12, №13 или №14 в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 31 показаны результаты подтверждения термодинамической структурной стабильности связей между рецептором трансферрина и фрагментом связывания спиральной области №15, №16, №17, №18, №19 или №20 в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 32 показаны результаты подтверждения термодинамической структурной стабильности связей между рецептором трансферрина и фрагментом связывания спиральной области №21, №22, №23 или №24 в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 33 показаны результаты подтверждения термодинамической структурной стабильности связей между рецептором трансферрина и фрагментом связывания спиральной области №25, №27, №30, №32, №33 или №34 в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 34 показаны результаты подтверждения термодинамической структурной стабильности связей между рецептором трансферрина и фрагментом связывания спиральной области №36, №38 или №39 в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 35 показаны результаты подтверждения уровней внутриклеточной доставки фрагмента связывания спиральной области №04 в соответствии с вариантом осуществления с использованием линии эндотелиальных клеток головного мозга человека.

На фиг. 36 показаны результаты подтверждения уровней внутриклеточной доставки фрагмента связывания спиральной области №16, №19 или №20 в соответствии с вариантом осуществления с использованием линии эндотелиальных клеток головного мозга человека.

На фиг. 37 показаны результаты подтверждения уровней внутриклеточной доставки фрагмента связывания спиральной области №25, №26 или №27 в соответствии с вариантом осуществления с использованием линии эндотелиальных клеток головного мозга человека.

На фиг. 38 показаны результаты подтверждения уровней внутриклеточной доставки фрагмента связывания спиральной области №28, №29 или №31 в соответствии с вариантом осуществления с использованием линии эндотелиальных клеток головного мозга человека.

На фиг. 39 показаны результаты подтверждения уровней внутриклеточной доставки фрагмента связывания спиральной области №34, №35, №36 или №37 в соответствии с вариантом осуществления с использованием линии эндотелиальных клеток головного мозга человека.

На фиг. 40 показаны результаты подтверждения уровней внутриклеточной доставки фрагмента связывания спиральной области №38, №40 или №41 в соответствии с вариантом осуществления с использованием линии эндотелиальных клеток головного мозга человека.

На фиг. 41 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№02, F3№03, F3№04, F3№05 или F3№06 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 42 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№07, F3№08, F3№09, F3№10 или F3№11 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.



На фиг. 43 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№12, F3№13, F3№14 или F3№15 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 44 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№16, F3№17, F3№18, F3№19 или F3№20 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 45 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№21, F3№22, F3№23 или F3№24 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 46 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№25, F3№26 или F3№27 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 47 показаны результаты уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№28, F3№29, F3№30, F3№31 или F3№32 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 48 показаны результаты уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№33, F3№34, F3№35, F3№36 или F3№37 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 49 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№38, F3№39, F3№40 или F3№41 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 50 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F1№03, F5№03 или F3№03 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 51 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер

слитого белка F1№05, F5№05 или F3№05 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 52 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F1№06, F5№06 или F3№06 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 53 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F1№12, F5№12 или F3№12 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 54 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F1№16, F5№16 или F3№16 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 55 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F1№25, F5№25 или F3№25 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 56 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F1№27, F5№27 или F3№27 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 57 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F1№31, F5№31 или F3№31 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 58 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F1№37, F5№37 или F3№37 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 59 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F1№40, F5№40 или F3№40 в соответствии с вариантом осуществления на животной модели с использованием набора для ELISA IgG1 человека.

На фиг. 60 показаны результаты подтверждения изменений силы связывания антител IgG1 с PD-L1 в зависимости от присутствия или отсутствия фрагмента связывания №01 в проникающих через гематоэнцефалический барьер слитых белках F3№01 и F3'№01 в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 61 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ISF, подтвержденные с использованием набора для ELISA IgG1 человека, после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№25-Тau, который предусматривает тау-специфическое антитело IgG1, где уровень выражен как кратность увеличения по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 62 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ISF, подтвержденные с использованием набора для ELISA IgG1 человека, после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№27-Тau или F3№36-Тau, которые предусматривают тау-специфическое антитело IgG1, где уровень выражен как кратность увеличения по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 63 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга, подтвержденные с использованием набора для ELISA IgG1 человека, после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№25-PD1, который предусматривает PD1-специфическое антитело IgG1, где уровень выражен как кратность увеличения по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 64 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга, подтвержденные с использованием набора для ELISA IgG1 человека, после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№25-HER2, который предусматривает HER2-специфическое антитело IgG1, где уровень выражен как кратность увеличения по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 65 показаны результаты подтверждения уровней антител IgG1 в ткани головного мозга, подтвержденные с использованием набора для ELISA IgG1 человека, после внутривенного введения проникающего через гематоэнцефалический барьер слитого белка F3№25-Аβ, который предусматривает Аβ-специфическое антитело IgG1, где уровень выражен как кратность увеличения по сравнению с контрольной группой.

#### Лучший вариант осуществления

#### Вариант осуществления настоящего изобретения

Далее в данном документе представлены предпочтительные примеры, помогающие в понимании настоящего изобретения. Однако приведенные ниже примеры представлены только для облегчения понимания настоящего изобретения, и содержание настоящего изобретения не ограничивается следующими примерами.



F3№01	9 x10 <sup>6</sup>	53,3	106,7	8,0	0,8	7,2	Меньше 1 мин
-------	--------------------	------	-------	-----	-----	-----	-----------------

После этого питательную среду и усилитель обрабатывали в день 1 культивирования и питательную среду обрабатывали и культивировали в день 5 культивирования. Трансфицированные клетки получали, когда жизнеспособность клеток составляла 70% или меньше или через 8 дней после проведения трансфекции. После этого образец, содержащий трансфицированные клетки, центрифугировали при 4500 об/мин и 25°C в течение 15 минут и из него собирали супернатант. После этого супернатант фильтровали с использованием фильтра 0,22 мкм. После этого фильтрат очищали с использованием таких способов очистки, как аффинная хроматография и эксклюзионная хроматография, с получением отдельных слитых белков. Очищенное антитело анализировали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC), электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и масс-спектрометрии для подтверждения результатов очистки.

Между тем, в слитом белке в соответствии с данным примером подробное описание фрагмента связывания со спиральной областью TfR, антитела IgG1 и т. д. являются следующими.

#### [Пример 1]

Название	Композиция	Подробное описание
F3№01	Фрагмент связывания	GHHERLKSDEWSVTSG (SEQ ID NO: 3)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

#### [Пример 2]

Название	Композиция	Подробное описание
F3№02	Фрагмент связывания	SREERLEEDRRRVDSG (SEQ ID NO: 4)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1

	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи
--	-----------------------------------	--

**[Пример 3]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№03	Фрагмент связывания	TREAARRADEAEVDAG (SEQ ID NO: 5)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 4]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№04	Фрагмент связывания	GHDEKCLKSDEKLVYSQ (SEQ ID NO: 6)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 5]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№05	Фрагмент связывания	SREERRLADEQEVLSG (SEQ ID NO: 7)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 6]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№06	Фрагмент связывания	SREAALAADEAAVESG (SEQ ID NO: 8)

	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 7]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№07	Фрагмент связывания	GLDEKCLKSDETLVYSQ (SEQ ID NO: 9)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 8]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№08	Фрагмент связывания	SEEERRQEDEEEVERG (SEQ ID NO: 10)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 9]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№09	Фрагмент связывания	SHLERTKSDEWSIISEGL (SEQ ID NO: 11)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 10]**

Название	Композиция	Подробное описание
----------	------------	--------------------

F3№10	Фрагмент связывания	SREERLREDERRVEEG (SEQ ID NO: 12)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 11]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№11	Фрагмент связывания	SREERLREDEEEVESG (SEQ ID NO: 13)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 12]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№12	Фрагмент связывания	SREERLEEDKQRVDSG (SEQ ID NO: 14)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 13]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№13	Фрагмент связывания	SREERLQQDEQEVDQG (SEQ ID NO: 15)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи



**[Пример 14]**

<b>Название</b>	<b>Композиция</b>	<b>Подробное описание</b>
F3№14	Фрагмент связывания	SAEEERQRDREEVDNG (SEQ ID NO: 16)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 15]**

<b>Название</b>	<b>Композиция</b>	<b>Подробное описание</b>
F3№15	Фрагмент связывания	TAEERQANEELVEAG (SEQ ID NO: 17)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 16]**

<b>Название</b>	<b>Композиция</b>	<b>Подробное описание</b>
F3№16	Фрагмент связывания	GLQEKLSDEWSVLSQ (SEQ ID NO: 18)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 17]**

<b>Название</b>	<b>Композиция</b>	<b>Подробное описание</b>
F3№17	Фрагмент связывания	SREERRREDEREVEEG (SEQ ID NO: 19)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1

	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи
--	-----------------------------------	--

**[Пример 18]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№18	Фрагмент связывания	SREERLREDEEEVDAG (SEQ ID NO: 20)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 19]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№19	Фрагмент связывания	GLQEKLKSDEKLVHSQ (SEQ ID NO: 21)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 20]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№20	Фрагмент связывания	GDEEKLKSDEELVDSQ (SEQ ID NO: 22)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 21]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№21	Фрагмент связывания	SREERRQADEEEVDSG (SEQ ID NO: 23)

	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 22]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№22	Фрагмент связывания	SEEEEREEDDEEEVESG (SEQ ID NO: 24)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 23]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№23	Фрагмент связывания	GLDEKCLKSDEKLVDSQ (SEQ ID NO: 25)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 24]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№24	Фрагмент связывания	GLDEKCLKSDEDLVYSQ (SEQ ID NO: 26)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

## 2. Получение слитого белка, предусматривающего тетравалентную вторую группу фрагментов связывания

Слитые белки, включающие вторую группу фрагментов связывания, получали таким же образом, как описано выше. Между тем, в слитых белках в соответствии с данным примером подробное описание фрагмента связывания со спиральной областью TfR, антитела IgG1 и т. д. являются следующими.

### [Пример 25]

Название	Композиция	Подробное описание
F3№25	Фрагмент связывания	SHHERLKSDEWSVTSGGL (SEQ ID NO: 27)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

### [Пример 26]

Название	Композиция	Подробное описание
F3№26	Фрагмент связывания	SHHERLKSDEWSVTSG (SEQ ID NO: 28)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

### [Пример 27]

Название	Композиция	Подробное описание
F3№27	Фрагмент связывания	SHHERLKSDKWDVESGGL (SEQ ID NO: 29)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 28]**

<b>Название</b>	<b>Композиция</b>	<b>Подробное описание</b>
F3№28	Фрагмент связывания	LGHHERLKSDEWSVTSGGLIESESAET (SEQ ID NO: 30)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 29]**

<b>Название</b>	<b>Композиция</b>	<b>Подробное описание</b>
F3№29	Фрагмент связывания	ESKAVKWSALGHHERLKSDEWSVTSGGLIESESAET (SEQ ID NO: 31)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 30]**

<b>Название</b>	<b>Композиция</b>	<b>Подробное описание</b>
F3№30	Фрагмент связывания	SHHERLKSDEWNVTSR (SEQ ID NO: 32)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 31]**

<b>Название</b>	<b>Композиция</b>	<b>Подробное описание</b>
F3№31	Фрагмент связывания	HERLKSDEWSVKSG (SEQ ID NO: 33)

	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 32]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№32	Фрагмент связывания	GHHERLKSDEWSVT (SEQ ID NO: 34)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 33]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№33	Фрагмент связывания	SHHERLKSDEWSVTSW (SEQ ID NO: 35)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 34]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№34	Фрагмент связывания	SHHERLKADEWSVTSG (SEQ ID NO: 36)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 35]**

Название	Композиция	Подробное описание
----------	------------	--------------------

F3№35	Фрагмент связывания	GHHERLKSDEWSVTSGGL (SEQ ID NO: 37)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 36]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№36	Фрагмент связывания	SHHERLKSDTWSVESGGL (SEQ ID NO: 38)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 37]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№37	Фрагмент связывания	ESKAVKWSALGHNEALKSDEWSVTSGGLIESESAET (SEQ ID NO: 39)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 38]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№38	Фрагмент связывания	GHHERLKSDFWSVTSG (SEQ ID NO: 40)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1

	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи
--	--------------------------------------	---

**[Пример 39]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№39	Фрагмент связывания	GHHERLKSDEWS (SEQ ID NO: 41)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 40]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№40	Фрагмент связывания	ESKAVKWSALAHHERLKSDEWSVTSGGLIESESAET (SEQ ID NO: 42)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи

**[Пример 41]**

Название	Композиция	Подробное описание
F3№41	Фрагмент связывания	GHHERLKSHQWEVESG (SEQ ID NO: 43)
	Валентность фрагмента связывания	4-валентный
	Антитело IgG1	Антитело IgG1 к PD-L1
	Связывающий участок антитела IgG1	С-конец каждой из тяжелой цепи и легкой цепи



## [Сравнительные примеры]

### Сравнительные примеры 1-22. Получение слитого белка, связанного с двухвалентным фрагментом связывания со спиральной областью TfR

Получали слитый белок, в котором фрагменты связывания со спиральной областью TfR были связаны либо с С-концевой областью тяжелой цепи, либо с С-концевой областью легкой цепи в антителе IgG1 (F1, F5). В частности, в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR использовали в общей сложности шесть репрезентативных фрагментов связывания (№01, №03, №05, №06, №12 и №16) из первой группы фрагментов связывания и в общей сложности 5 репрезентативных фрагментов связывания (№25, №27, №31, №37 и №40) из второй группы фрагментов связывания.

#### **1. Получение слитого белка, предусматривающего двухвалентную первую группу фрагментов связывания**

Слитый белок получали таким же способом, как описано в примерах выше, при этом слитый белок предусматривает: фрагмент связывания №01, №03, №05, №06, №12 или №16 в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR; антитело IgG1 к PD-L1 в качестве антитела IgG1; и два фрагмента связывания связаны с С-концевой областью тяжелой цепи антитела IgG1 (сравнительные примеры 1-6: F1№01, F1№03, F1№05, F1№06, F1№12 и F1№16).

Кроме того, слитый белок получали таким же способом, как описано в примерах выше, при этом слитый белок предусматривает: фрагмент связывания №01, №03, №05, №06, №12 или №16 в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR; антитело IgG1 к PD-L1 в качестве антитела IgG1; и два фрагмента связывания связаны с С-концевой областью легкой цепи антитела IgG1 (сравнительные примеры 7-12: F5№01, F5№03, F5№05, F5№06, F5№12 и F5№16).

#### **2. Получение слитого белка, включающего в себя двухвалентную вторую группу фрагментов связывания**

Слитый белок получали таким же способом, как описано в примерах выше, при этом слитый белок имеет структуру, предусматривающую: фрагмент связывания №25, №27, №31, №37 или №40 в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR; антитело IgG1 к PD-L1 в качестве антитела IgG1; и два фрагмента связывания связаны с С-концевыми областями тяжелой цепи антитела IgG1 (в соответствии со сравнительными примерами 13-17: F1№25, F1№27, F1№31, F1№37 и F1№40).

Кроме того, слитый белок получали таким же способом, как описано в примерах выше, при этом слитый белок имеет структуру, предусматривающую: фрагмент связывания №25, №27, №31, №37 или №40 в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR;

антитело IgG1 к PD-L1 в качестве антитела IgG1; и два фрагмента связывания связаны с C-концевыми областями легкой цепи антитела IgG1 (в соответствии со сравнительными примерами 18-22: F5№25, F5№27, F5№31, F5№37 и F5№40).

### **[Экспериментальные примеры]**

#### **Экспериментальный пример 1. Оценка функциональных характеристик проникающего через ВВВ слитого белка F3№01**

##### **1-1. Оценка функциональных характеристик фрагмента связывания**

В данном экспериментальном примере функциональные характеристики фрагмента связывания №01 проникающего через ВВВ слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления подлежали определению в отношении способности связывания со спиральной областью TfR и в отношении оценки уровня доставки в эндотелиальные клетки головного мозга человека посредством связывания.

##### **(1) Подтверждение связывания между спиральной областью TfR и фрагментом связывания**

В полученном слитом белке F3№01 подтверждали связывание между фрагментом связывания спиральной области и TfR с помощью криоэлектронной микроскопии (Cryo-EM). В частности, для получения остеклованного замороженного препарата получали препарат образца L7 TfR с концентрацией 10 мкМ с использованием буферного раствора с 50 мМ Трис, 150 мМ NaCl и pH 7,6. После этого проводили остеклование препарата образца L7 TfR с использованием сетки Quantifoil Cu 1,2/1,3 400 меш. В данном случае для улучшения взаимодействия между препаратом образца и сеткой использовали тлеющий разрядник, вызывающий разряд отрицательного заряда на поверхности сетки. После этого на разряженную сетку вводили препарат 3 мкл образца L7 TfR и проводили его остеклование в условиях времени блоттинга (7 секунд), силы блоттинга (0), времени ожидания (0 секунд), 4°C и влажности 95%. Также проводили анализ Cryo-EM с использованием детекторов Glacios 200 кВ, Krios G4 300 кВ, Falcon 4 и K3. В данном случае объектив настраивали на следующие условия: коэффициент сферической аберрации (2,7), диафрагма 0,50 мкм, увеличение (120 тыс.) и время экспозиции (6,55 секунды). Кроме того, анализ проводили в условиях 50 фракций на образец, 225 кадров, величины пикселя 0,894 Å/пк, мощности дозы 6,1 е/пк/с, суммарной дозы 49,93 е/Å<sup>2</sup> и диапазона дефокусировки в пределах от -1,25 до -2,75 с интервалом 0,25. В общей сложности по меньшей мере 5 миллионов частиц сначала захватывали, а затем использовали для первоначальной 2D-классификации. После этого примерно 2 миллиона частиц окончательно отбирали и подвергали 3D-уточнению, и применяли C1-симметрию и C2-симметрию для получения 3D-карты электронной плотности с разрешением приблизительно 3,4 Å. На карту наложили

модель совместного комплекса (PDB: 3s9n) TfR и предсказали участок связывания и ключевые остатки путем сравнения существующего способа связывания и способа связывания фрагмента связывания спиральной области.

Кроме того, связывание между TfR и фрагментом связывания спиральной области №01 подтвердили посредством моделирования докинга. В частности, моделирование докинга проводили для подтверждения того, обладает ли фрагмент связывания №01 способностью связывания со спиральной областью TfR. Структуру фрагмента связывания №01 моделировали с использованием программы RosettaRelax, а положение, которое, как ожидается, будет взаимодействовать со спиральной областью TfR, моделировали с использованием структурной информации и термодинамических расчетов. После этого с помощью программы RosettaDocking проводили моделирование докинга, позволяющее найти наиболее стабильное положение путем случайного изменения положения фрагмента связывания и расчета взаимодействия со спиральной областью. Для каждого идентификационного номера последовательности провели 20000 вариантов моделирования, а полученные данные проанализировали на основе гомологии с исходной модельной структурой и термодинамической структурной стабильности.

В результате, как показано на фиг. 1 и 2, было подтверждено, что спиральная область, доступная для взаимодействия с TfR, открыта для внешнего воздействия. Кроме того, путем подбора модели, которая сохраняет эндогенный способ связывания трансферрина с TfR, на 3D-карте электронной плотности с разрешением 3,4 Å было подтверждено, что электронная плотность, эквивалентная гликозилированию, которая не наблюдалась в существующих TfR, возникает в предсказанном идеальном диапазоне. Кроме того, связывание с фрагментом связывания было сформировано так, чтобы оно соответствовало форме структуры альфа-спирали, и благодаря этому было подтверждено взаимодействие между спиральной областью TfR и фрагментом связывания. Кроме того, как показано на фиг. 3, было подтверждено, что фрагмент связывания №01, соответствующий SEQ ID NO: 3, стабильно связывается со спиральной областью TfR.

## **(2) Подтверждение доставки в эндотелиальные клетки головного мозга человека**

Целью исследования было определить, способен ли фрагмент связывания спиральной области №01, связывание которого с TfR было подтверждено в разделе (1) экспериментального примера 1-1, доставляться в клетки hCMEC/D3, которые представляют собой эндотелиальные клетки головного мозга человека, входящие в состав BBB человека, посредством вышеупомянутого взаимодействия. В частности, клетки hCMEC/D3 культивировали в условиях 37°C и 5% CO<sub>2</sub> с использованием синтетического культурального раствора, минимальной среды 2 для эндотелиальных клеток (EBM2),

содержащей факторы роста. После этого, когда клеточное насыщение достигало 80%, клетки разделяли и добавляли  $4 \times 10^3$  клеток к 40 мкл культуральной среды. Затем клетки инокулировали на 384-луночный планшет, центрифугировали в течение 10 секунд и культивировали в течение по меньшей мере 18 часов в условиях  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ , чтобы дать клеткам возможность прикрепиться к планшету. Тем временем к 1 мг пептида фрагмента связывания добавляли 500 мкл 1x PBS и смешивали с ним, и концентрацию смеси измеряли с использованием спектрометра в ультрафиолетовой-видимой области. Пептид разбавляли до конечной концентрации 200 мкМ, а затем хранили при  $4^\circ\text{C}$ . После этого пептид в концентрации 200 мкМ разводили в культуральном растворе EBM2 в концентрации, в 5 раз превышающей концентрацию обработки. В каждую лунку инокулировали по 10 мкл пептида, разведенного в 5 раз, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 секунд и культивировали в течение 2 часов в условиях температуры  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . После этого культивируемые клетки промывали с помощью 1x PBS и в каждую лунку инокулировали 75 мкл 4% PFA и хранили при комнатной температуре в течение 30 минут для обеспечения иммобилизации. В данном случае раствор Hoechst добавляли к 4% PFA для одновременного проведения ядерного окрашивания, а через 30 минут клетки визуализировали с помощью Cytation5 (Biotek) для оценки уровня доставки в клетки.

В результате, как показано на фиг. 4, эффективная способность доставки фрагмента связывания №01, соответствующего SEQ ID NO: 3, в клетки была подтверждена в результате оценки уровня доставки в клетки с использованием линии эндотелиальных клеток головного мозга человека (hCMEC/D3).

## **1-2. Оценка уровня проницаемости BBB**

В данном экспериментальном примере оценивали уровень захвата антител IgG1 тканью головного мозга при внутривенном введении проникающего через BBB слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления.

### **(1) Оценка уровня антител IgG1 в тканях головного мозга с течением времени**

Препарат, содержащий 20 мг/кг слитого белка F3№01, вводили мышам C57BL/6 внутривенно через хвостовую вену, а группу, которой внутривенно вводили только антитело IgG1, использовали в качестве контрольной группы. Через 1, 4, 7 или 14 дней мышей подвергали анестезии и собирали кровь из кровеносных сосудов орбит глаз или из брюшной вены. После этого кровь удаляли посредством перфузии физиологического раствора. Впоследствии головной мозг мыши извлекали, а извлеченную ткань головного мозга быстро замораживали жидким азотом и хранили в низкотемпературной морозильной камере до применения. Тем временем извлеченную ткань головного мозга гомогенизировали с использованием раствора для экстракции белка, а затем образец

гомогенизированной ткани головного мозга растворяли при 4°C с использованием мешалки с вращающимся барабаном. После этого растворенный образец ткани головного мозга центрифугировали и получали из него супернатант для получения лизата головного мозга. После этого измеряли уровень антител IgG1 в лизате головного мозга с использованием набора для ELISA IgG1 человека. В частности, получали стандарт (STD) путем разведения до каждой концентрации с использованием раствора для экстракции белка, а образец (SPL), содержащий лизат головного мозга, получали в соответствии с каждым коэффициентом разведения с использованием раствора для экстракции белка. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл каждого из двух растворов. После этого в каждую лунку дополнительно добавляли по 50 мкл смеси Ab, содержащейся в наборе для ELISA, и затем обеспечивали прохождение реакции при 4°C. После этого планшет промывали и в каждую лунку промытого планшета добавляли по 100 мкл субстрата ТМВ. Впоследствии, используя устройство для считывания микропланшетов, добавляли стоп-раствор, когда значение OD STD1 достигало 1,0 при длине волны 600 нм. После измерения значения при длине волны 450 нм получали стандартную кривую с использованием 4-параметрической логистической регрессии и на ее основе рассчитывали концентрацию антител IgG1, присутствующих в образце (SPL).

В результате, как показано на фиг. 5, наблюдаемый уровень антител IgG1 в ткани головного мозга группы введения F3№01 в соответствии с вариантом осуществления был значительно выше, чем у контрольной группы, в течение 14 дней после введения. В частности, группа введения F3№01 продемонстрировала высокий уровень доставки в пределах от приблизительно 25-кратного до приблизительно 320-кратного относительно контрольной группы.

## **(2) Оценка уровня антител IgG в ткани головного мозга с использованием образца ISF**

После того как слитый белок проникал в BBB, определяли количество слитого белка (слитого белка, присутствующего в образце ISF), присутствующего в несвязанной форме в паренхиме головного мозга, с последующим получением обнаруженного значения. Соответственно оценивали количество слитого белка, поступившего в паренхиму головного мозга из сосудов головного мозга, т. е. количество слитого белка, которое проникло через BBB. В частности, после анестезии мыши C57BL/6 кожу на голове мыши разрезали и использовали сверло для формирования перфорации в кости черепа, прилегающей к области гиппокампа. После этого в образовавшуюся краниальную перфорацию вводили направляющую канюлю и фиксировали ее смолой. Разрезы кожи зашивали, чтобы предотвратить воздействие извне на область краниальной перфорации, и

мыши давали возможность восстановиться в течение двух недель. После этого восстановившейся мыши вводили внутривенно через хвостовую вену препарат, содержащий 20 мг/кг слитого белка (F3№01).

Через 4 часа, 1 день или 4 дня после внутривенного введения мыши слитого белка мышь подвергали анестезии и зонд, активированный для обнаружения антител IgG1, вставляли в направляющую канюлю мыши. Вслед за этим, пропуская цереброспинальную жидкость (CSF) содержащую BSA, с постоянной скоростью, собирали образец интерстициальной жидкости (ISF), содержащей слитый белок, и хранили его при  $-20^{\circ}\text{C}$ . После этого уровень антител IgG1 в образце ISF измеряли с использованием набора для ELISA IgG1 человека. В частности, получали стандарт (STD) и образец (SPL), которые разбавляли до каждой концентрации с использованием буфера для образцов NS, а затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл каждого из двух растворов. После этого в каждую лунку дополнительно добавляли по 50 мкл смеси Ab, содержащейся в наборе для ELISA, с последующей инкубацией при  $4^{\circ}\text{C}$ . После этого планшет промывали и в каждую лунку промытого планшета добавляли по 100 мкл субстрата TMB. Впоследствии, используя устройство для считывания микропланшетов, добавляли стоп-раствор, когда значение OD STD1 достигало 1,0 при длине волны 600 нм, и измеряли значение при длине волны 450 нм. Между тем, в качестве контрольной группы использовали группу, которой внутривенно вводили только антитело IgG1.

В результате, как показано на фиг. 6, было подтверждено, что уровень антител IgG1 в образце ISF был значительно повышен в группе введения F3№01 в соответствии с вариантом осуществления по сравнению с контрольной группой.

### **(3) Оценка уровня антител IgG посредством визуализации сосудов головного мозга на животной модели**

При использовании животной модели с имплантированным краниальным окном и двухфотонного микроскопа целью получения изображений цереброваскулярной области в реальном времени было подтверждение явления транцитоза слитого белка в BBB. В частности, использовали мышь Tie2-GFP Tg с имплантированным краниальным окном, и с помощью двухфотонного микроскопа получали структурные изображения из области, в которой берут начало кровеносные сосуды мягкой мозговой оболочки, до глубины приблизительно 300 мкм, включая 2-3 кортикальных слоя. После этого, чтобы наблюдать транцитоз связанного с Alexa-568 слитого белка, через хвостовую вену вводили 26 мг/кг связанного с Alexa-568 слитого белка. В той же 3D-области, что и изображение, полученное через 1 день после инъекции слитого белка, измеряли интенсивность флуоресценции GFP в первом канале, а интенсивность флуоресценции Alexa-568, связанного со слитым белком,

измеряли во втором канале. Измерение интенсивности флуоресценции проводили в течение 20 минут в условиях с пространственным разрешением 100 нм или менее и временным разрешением менее минуты в области, включающей по меньшей мере 3 сегмента кровеносного сосуда, начиная с посткапиллярной вены. Чтобы наблюдать явление транцитоза, все полученные изображения для анализа временных рядов выравнивали по первому изображению временного ряда, выравнивали по координатам первого изображения временного ряда, а затем разделяли на внутрисосудистые области, области сосудистой стенки и внесосудистые области с помощью сигналов GFP первого канала. Среди сигналов Alexa-568, связанного со слитым белком, наблюдаемых во втором канале на основе внутрисосудистых областей, областей сосудистой стенки и внесосудистых областей, разделенных по сигналам GFP первого канала, область, сгруппированную вблизи сосудистой стенки, переименовали во внутрисосудистую область (ROI 1; представляющая интерес область); область сосудистой стенки (ROI 2) и внесосудистую область (ROI 3), а изменения в концентрации Alexa-568, связанного со слитым белком, в этих трех ROI наблюдали с течением времени.

В результате наблюдения изменений транцитоза в реальном времени в трех ROI в течение 20 минут в первый день после инъекции слитого белка в соответствии с вариантом осуществления, как показано на фиг. 7 и 8, было подтверждено, что не наблюдалось никаких изменений в концентрации слитого белка во внутрисосудистой области ROI 1, тогда как в области сосудистой стенки ROI 2, где существуют кластеры, слитый белок группировался в течение 10 минут и мигрировал за пределы кровеносного сосуда, так что концентрация слитого белка снижалась. Затем, с момента, когда кластеров больше не наблюдалось (более 10 минут), концентрация слитого белка находилась в равновесном состоянии. Кроме того, что касается изменения концентрации слитого белка во внесосудистой области ROI 3, было замечено, что кластеры слитого белка, первоначально наблюдаемые в области сосудистой стенки ROI 2, достигали области за пределами кровеносного сосуда через приблизительно 6 минут, и в это же время концентрация слитого белка увеличивалась. После этого наблюдалось достижение пика концентрации через приблизительно 12 минут. Приведенные выше результаты показывают, что транцитоз слитого белка происходил за счет кластеризации вблизи BBB с последующей экстравазацией слитого белка в течение нескольких минут.

### **1-3. Оценка функциональных характеристик на основе изменения валентности фрагмента связывания**

20 мг/кг каждого из слитых белков F3№01, F1№01 и F5№01 составляли для мышей C57BL/6 и вводили внутривенно через хвостовую вену. Через 4 дня после этого проводили

измерение уровня антител IgG1 в ткани головного мозга таким же образом, как в разделе (1) экспериментального примера 1-2. После этого получали стандартную кривую с использованием 4-параметрической логистической регрессии и на ее основе рассчитывали концентрацию антител IgG1, присутствующих в образце (SPL). Кроме того, чтобы наблюдать за состоянием доставки антител внутри сосудов головного мозга, головной мозг животного извлекали через 1 день после внутривенного введения слитого белка. После анестезии животного вскрывали грудную полость животного и вводили иглу-бабочку в левый желудочек для введения физиологического раствора и дренирования его в правое предсердие с целью удаления крови из организма. После этого для фиксации клеток вводили 4% параформальдегид (PFA) и рассекали черепную кость, чтобы извлечь головной мозг. Извлеченный головной мозг хранили в 4% PFA в течение одного дня для дополнительной фиксации клеток, а затем в течение 3 дней в 30% растворе сахарозы для предотвращения разрушения клеток при получении срезов головного мозга. Головной мозг мыши, хранившийся в 30% растворе сахарозы в течение 3 дней, помещали в форму для получения срезов головного мозга, туда же вводили сложный раствор с оптимальной температурой резки, и головной мозг хранили при  $-60^{\circ}\text{C}$  для охлаждения головного мозга. Образец охлажденного головного мозга нарезали на срезы головного мозга толщиной 40 мкм с помощью микрокриостата, и каждый срез головного мозга использовали для иммуноокрашивания. После этого проводили иммуноокрашивание с использованием антитела к TfR и антитела к слитому белку, результаты фотографировали и подтверждали с помощью конфокального микроскопа.

В результате, как показано на фиг. 9, через 4 дня после внутривенного введения уровень антител IgG1 в ткани головного мозга количественно определяли как относительное значение по отношению к контрольной группе и сравнивали. В результате было подтверждено, что по сравнению с контрольной группой в группе, которой вводили тетравалентный слитый белок, в котором фрагменты связывания были связаны с каждой из четырех областей, включая С-концы тяжелой цепи и С-концы легкой цепи, т. е. в группе введения F3№01, наблюдалось приблизительно 80-кратное увеличение уровня антител IgG1 в ткани головного мозга. С другой стороны, группы, которым вводили двухвалентный слитый белок, в котором фрагменты связывания были связаны с двумя областями, включая С-концы тяжелой цепи или С-концы легкой цепи, т. е. группа введения F1№01 и группа введения F5№01, не показали существенной разницы в уровне антител IgG1 относительно контрольной группы, несмотря на использование одного и того же фрагмента связывания.

Кроме того, как показано на фиг. 10 и 11, не наблюдалось никакого связывания между слитым белком и TfR в сосудах головного мозга в группе введения F1№01 и в группе



введения F5№01, тогда как связывание между слитым белком и TfR наблюдалось в сосудах головного мозга группы введения F3№01. В результате количественной оценки этих данных уровень слитого белка, присутствующего в области, где находился TfR, показал существенное различие.

#### **1-4. Оценка взаимодействия между слитым белком и рецептором TfR**

Исходя из того, что высокое проникновение через BBB, подтвержденное в экспериментальном примере 1-2, обусловлено взаимодействием между фрагментом связывания и TfR, присутствующим в ткани головного мозга, провели анализ на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЕМ) с негативным контрастированием, чтобы подтвердить взаимодействие между слитым белком, т. е. тетравалентным фрагментом связывания, и TfR. В частности, образцы, содержащие слитый белок и TfR, добавленные вместе, получали в качестве экспериментальных групп, а в качестве контрольных групп получали (1) группу, в которой добавляли только нативный TfR, (2) группу, в которой добавляли только антитело IgG1 без фрагмента связывания, (3) группу, в которой TfR и антитело IgG1 без фрагмента связывания добавляли вместе без фрагмента связывания. Все образцы количественно оценивали в концентрации 15 мкМ с использованием буферного раствора 50 мМ Трис, 150 мМ NaCl и pH 7,4, и группу, в которой слитый белок и TfR добавляли вместе, и группу, в которой антитело IgG1 и TfR добавляли вместе, смешивали в определенном молярном соотношении (1:2) для проведения реакции при 4°C в течение 1 часа. После этого все образцы разбавляли до соответствующей концентрации и проводили отбор проб на сетке ТЕМ. Сетка для препарата электронного микроскопа представляла собой сетку F/C Cu размером 400 меш, и по 10 мкл каждого образца, полученного, как описано выше, вводили на сетку и обеспечивали протекание реакции в течение 1 минуты, а затем сетку протирали с помощью фильтровальной бумаги. После этого на сетку вводили 10 мкл раствора 2% уранилацетата, а оставшийся раствор снова удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Сетку также подвергали воздействию комнатной температуры в течение приблизительно 12 часов для удаления любых остатков влаги. Препараты на сетке, полученные, как описано выше, исследовали с помощью ТЕМ Jeol Gatan 60 кВ, а анализ образцов с негативным контрастированием проводили при увеличении от 60 до 200 тыс.

В результате, как показано на фиг. 12, группа, в которой TfR и антитело IgG1 без фрагмента связывания добавляли вместе ((c) на фиг. 12), а также группа, в которой добавляли только нативный TfR, и группа, в которой добавляли антитело IgG1 без фрагмента связывания ((a) и (b) на фиг. 12), показали относительно однородное распределение каждого компонента, подтверждая отсутствие взаимодействий между ними.

С другой стороны, группа, в которой слитый белок в соответствии с вариантом осуществления и нативный TfR добавляли вместе ((d) на фиг. 12), показала образование комплекса за счет взаимодействия с TfR. Кроме того, на основе этих экспериментальных результатов было обнаружено, что каждый из тетравалентных фрагментов связывания в соответствии с вариантом осуществления взаимодействует со спиральной областью TfR с образованием комплекса, как показано на фиг. 13. В частности, принимая во внимание экспериментальные результаты в экспериментальных примерах 1-3 (см. фиг. 9), экспериментальные результаты этого примера показывают, что взаимодействия внутри комплексов могут быть основным фактором улучшения проникновения через BBB.

#### **1-5. Оценка эффективности селективной доставки в ткани головного мозга**

В данном экспериментальном примере оценивали органоспецифический уровень распределения антител IgG1 при внутривенном введении проникающего через BBB слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления. В частности, препарат, содержащий 20 мг/кг слитого белка F3№01, вводили мышам C57BL/6 внутривенно через хвостовую вену, а группу, которой внутривенно вводили только антитело IgG1, использовали в качестве контрольной группы. Затем через 1 или 4 дня после внутривенного введения проводили измерение уровня антител IgG1 в общей сложности в 6 органах (головной мозг, легкое, селезенка, почка, печень и мышца) таким же образом, как описано в разделе (1) экспериментального примера 1-2, и сравнили.

В результате через 1 день после внутривенного введения проникающего через BBB слитого белка F3№01 уровень органоспецифического распределения антитела IgG1 являлся таким, как показано на фиг. 14, а через 4 дня после внутривенного введения проникающего через BBB слитого белка F3№01 уровень органоспецифического распределения антитела IgG1 являлся таким, как показано на фиг. 15. Другими словами, в контрольной группе, в которой внутривенно вводили антитело IgG1, наблюдался самый высокий уровень распределения антитела IgG1 в легких из всех органов и относительно низкий уровень распределения в ткани головного мозга, тогда как было подтверждено, что в группе введения F3№01 имел место очень высокий уровень антител IgG1 в ткани головного мозга по сравнению с другими органами. Со ссылкой на приведенные выше результаты было подтверждено, что слитый белок, содержащий функциональную структуру в соответствии с вариантом осуществления, может способствовать снижению побочных эффектов лекарственных средств на основе антитела за счет уменьшения распределения антител IgG в тканях, отличных от ткани головного мозга, вследствие селективного распределения антител IgG в ткани головного мозга при внутривенном введении.

## **1-6. Оценка снижения побочных эффектов за счет селективной доставки в ткани головного мозга**

### **(1) Оценка уровня ретикулоцитов**

После введения проникающего через BBB слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления была поставлена цель определить воздействие на ретикулоциты, которые являются одними из клеток, в которых TfR экспрессируется на высоком уровне. Подробно, препарат, содержащий 20 мг/кг или 50 мг/кг слитого белка F3№01, вводили внутривенно через хвостовую вену мышам C57BL/6. Через 0, 1, 4 или 7 дней после внутривенного введения мышам слитого белка получали образец крови объемом 50 мкл из кровеносного сосуда внутри орбиты глаза мыши с помощью гепаринизированной капиллярной пробирки. После этого смешивали 30 мкл образца крови и 100 мкл свежего раствора метиленового синего и смешанный раствор оставляли при комнатной температуре на определенный период времени. После этого окрашенный образец крови наносили на предметное стекло и наблюдали под микроскопом для расчета процентного содержания ретикулоцитов среди всех эритроцитов. Между тем, в качестве контрольной группы использовали группу, которой внутривенно вводили антитело IgG1.

В результате, как показано на фиг. 16, в группе, которой вводили проникающий через BBB слитый белок F3№01 в соответствии с вариантом осуществления, процент ретикулоцитов среди общего количества эритроцитов был аналогичен проценту в контрольной группе.

### **(2) Фармакокинетическая оценка**

После введения мышам проникающего через BBB слитого белка F3№01 в соответствии с вариантом осуществления проводили фармакокинетическую оценку в плазме крови. Подробно, препарат, содержащий 20 мг/кг слитого белка F3№01, вводили внутривенно через хвостовую вену мышам. Образцы крови получали у мышей через 30 минут, 120 минут, 360 минут, 1 день, 2 дня, 4 дня, 7 дней или 14 дней после внутривенного введения мышам слитого белка. После этого образцы плазмы крови отделяли центрифугированием, предварительно обрабатывали для жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS), а затем подвергали анализу LC-MS. Между тем, в качестве контрольной группы использовали группу, которой внутривенно вводили антитело IgG1.

В результате, как показано на фиг. 17, фармакокинетический профиль в плазме крови в группе, которой вводили проникающий через BBB слитый белок F3№01 в соответствии с вариантом осуществления, был подобен профилю контрольной группы, и, таким образом, приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что распределение слитого белка в нескольких органах, содержащих TfR, было минимальным.

### **(3) Расчет соотношения в крови и плазме крови**

Чтобы убедиться, что приведенные выше экспериментальные результаты являются результатом селективной доставки в ткани головного мозга, т. е. отсутствия связывания с ретикулоцитами, содержащими TfR, и с тканями других органов, рассчитывали соотношение в крови и плазме крови (соотношение площадей пиков в супернатанте крови / соотношение площадей пиков в плазме крови). Подробно, проникающий через BBB слитый белок F3№01 в соответствии с вариантом осуществления добавляли к образцу плазмы крови и образцу крови до конечной концентрации 40 мкг/мл, а затем оставляли при комнатной температуре на 30 минут. После этого образец крови центрифугировали и отдельно получали супернатант крови. Образцы плазмы крови и супернатанта крови смешивали с раствором PBS, содержащим поверхностно-активное вещество, и магнитными гранулами, смесь культивировали и культуру дважды промывали с помощью PBS, содержащим поверхностно-активное вещество. В данном случае добавляли поверхностно-активное вещество RapiGest и дитиотреитол, инкубировали при 60°C в течение 50 минут и оставляли при комнатной температуре на 10 минут. После этого 1) добавляли йодуксусную кислоту и культивировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут, 2) добавляли трипсин и культивировали при 60°C в течение 24 часов последовательно, 3) добавляли HCl и культивировали при 37°C в течение 30 минут. После этого культуру центрифугировали с получением супернатанта, к супернатанту добавляли трипсин и рассчитывали соотношение крови к плазме крови (соотношение площадей пиков в супернатанте крови / соотношение площадей пиков в плазме крови) с использованием LC-MS. Между тем, группу, обработанную антителом IgG1, использовали в качестве контрольной группы.

В результате, как показано на фиг. 18, соотношение в крови и плазме крови в группе, которой вводили проникающий через BBB слитый белок F3№01 в соответствии с одним вариантом осуществления, также показало уровень, аналогичный уровню в контрольной группе, и, таким образом, было подтверждено, что приведенные выше экспериментальные результаты являются результатом того факта, что между слитым белком и ретикулоцитами, содержащими TfR, связывание не образовывалось. Кроме того, селективная доставка в ткани головного мозга была подтверждена со ссылкой на то, что проникающий через BBB слитый белок в соответствии с вариантом осуществления не демонстрировал высоких уровней TfR-опосредованной доставки в органы, отличные от ткани головного мозга.

**1-7. Оценка функциональных характеристик слитого белка, содержащего повторяющиеся фрагменты связывания**

В данном экспериментальном примере была поставлена цель определить, можно ли сохранить функциональные характеристики вышеупомянутого слитого белка, когда фрагмент связывания со спиральной областью TfR модифицируют с получением повтора. С этой целью, так же, как в примере выше, использовали слитый белок (F3'№01), имеющий структуру, в которой в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR используется фрагмент связывания, в котором фрагмент под SEQ ID NO: 3 повторяется дважды, в качестве антитела IgG1 используется антитело IgG1 к PD-L1 и в общей сложности четыре связывающих фрагмента связаны с С-концами каждой тяжелой и легкой цепей антитела IgG1.

### **(1) Оценка уровня антител IgG1 в тканях головного мозга с течением времени**

Уровень захвата антитела IgG1 в ткани головного мозга при внутривенном введении полученного проникающего через BBB слитого белка F3'№01 в соответствии с вариантом осуществления оценивали таким же образом, как в разделе (1) экспериментального примера 1-2.

В результате, как показано на фиг. 19, наблюдаемый уровень антител IgG1 в ткани головного мозга группы введения F3'№01 в соответствии с вариантом осуществления был выше, чем у контрольной группы, в течение 7 дней после введения. В частности, группа введения F3'№01 продемонстрировала высокий уровень доставки в пределах от приблизительно 18-кратного до приблизительно 160-кратного относительно контрольной группы.

### **(2) Оценка эффективности селективной доставки в ткань головного мозга**

Уровень органоспецифического распределения антитела IgG1 при внутривенном введении полученного проникающего через BBB слитого белка F3'№01 в соответствии с вариантом осуществления оценивали таким же образом, как в экспериментальном примере 1-5.

В результате через 1 день после внутривенного введения проникающего через BBB слитого белка F3'№01 уровень органоспецифического распределения антитела IgG1 являлся таким, как показано на фиг. 20, и через 4 дня после внутривенного введения проникающего через BBB слитого белка F3'№01 уровень органоспецифического распределения антитела IgG1 являлся таким, как показано на фиг. 21. Другими словами, было подтверждено, что группа введения F3'№01 характеризовалась очень высоким уровнем антитела IgG1, распределенного в ткани головного мозга по сравнению с другими органами.

Исходя из приведенных выше результатов было подтверждено, что в слитом белке, имеющем функциональную структуру в соответствии с вариантом осуществления, может

проявляться уникальная функциональная характеристика, такая как повышенный уровень захвата в ткани головного мозга и селективная доставка в ткани головного мозга, даже когда фрагмент связывания со спиральной областью TfR модифицируют с получением повтора.

### **1-8. Подтверждение специфического профиля экспрессии TfR в ткани головного мозга**

Что касается слитого белка, имеющего функциональную структуру, в которой тетравалентный фрагмент связывания в соответствии с вариантом осуществления связан с С-концами легкой цепи и С-концами тяжелой цепи антитела, было экспериментально подтверждено, как определено в примерах выше, что благодаря высокой степени проникновения через BBB не только значительно улучшалась доставка антитела IgG1 в ткань головного мозга, но также проявлялась высокая биобезопасность за счет селективной доставки в ткань головного мозга по сравнению с другими органами. Предполагая, что эта эффективность обусловлена взаимодействием между фрагментом связывания в соответствии с вариантом осуществления и рецептором трансферрина, присутствующим в ткани головного мозга, цель этого экспериментального примера состояла в подтверждении профиля экспрессии и характеристик рецептора трансферрина, распределенного в ткани головного мозга.

#### **(1) Подтверждение органоспецифического распределения TfR**

Собирали кровь из орбитальной вены или брюшной вены мыши C57BL/6 и перфузировали мышь физиологическим раствором для удаления крови. Ткань головного мозга извлекали из перфузированной мыши и сосуды головного мозга, паренхиму и сосудистое сплетение отдельно выделяли из ткани головного мозга. Из них экстрагировали общие белки с использованием буфера RIPA. Для других органов, таких как печень, легкие, почки и селезенка, собирали небольшое количество тканей и из них экстрагировали общие белки с использованием буфера RIPA. Экстрагированные белки смешивали с буфером для образца SDS-PAGE, денатурировали, загружали в гель SDS-PAGE, а затем переносили на PVDF-мембрану. После этого каждую белковую полосу идентифицировали на мембране с использованием антитела к TfR и антитела к бета-актину в качестве первичных антител, а интенсивность белковых полос измеряли с помощью программного обеспечения Image J.

В результате, как показано на фиг. 22, было подтверждено, что при количественном определении TfR, экспрессируемого в каждом органе, TfR экспрессировался в больших количествах в сосудах головного мозга и клетках крови, а также на значительном уровне в селезенке. Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что селективная доставка слитого белка в соответствии с вариантом осуществления в ткань головного мозга является не просто результатом количественных различий в экспрессии

TfR в каждом органе, а скорее может быть обусловлена взаимодействием между TfR со специфической экспрессией в сосудах головного мозга и фрагментом соединения в соответствии с вариантом осуществления или функциональной структурой, которая может формировать такие взаимодействия.

## **(2) Сравнение профилей экспрессии кластеров TfR**

Собирали кровь из орбитальной вены или брюшной вены мыши C57BL/6 и перфузировали мышь физиологическим раствором для удаления крови. Тем временем ткань головного мозга последовательно перфузировали физиологическим раствором и 4% параформальдегидом с получением образцов ткани головного мозга для окрашивания срезов головного мозга с помощью иммуногистологии. После этого для получения срезов головного мозга ткань головного мозга помещали в форму и добавляли среду для замораживания ткани, чтобы в достаточной степени погрузить ткань головного мозга, а затем форму хранили в низкотемпературной морозильной камере при  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение одного дня. Замороженные блоки головного мозга разрезали на срезы толщиной 40 мкм с помощью криостата. Эти срезы хранили в растворе PBS, содержащем 0,1% азидата натрия, до применения.

После этого срезы ткани добавляли в 24-луночный планшет и обеспечивали проведение реакции с помощью 500 мкл раствора PBS, содержащего 0,5% Triton-X 100, при комнатной температуре в течение 20 минут. После этого реакционный раствор заменяли раствором PBS и перемешивали с помощью пластинчатой мешалки. После этого срезы ткани добавляли к раствору PBS, содержащему 5% BSA и 0,1% Triton-X 100, обеспечивали проведение реакции при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем трижды промывали раствором PBS. В данном случае к нему добавляли антитело к TfR и антитело к CD31 для индуцирования реакции в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ , а затем трижды промывали раствором PBS. После этого к нему добавляли меченное Alexa 488 антитело к крысиному антителу и меченное Alexa 568 антитело к козьему антителу, обеспечивали проведение реакции при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем трижды промывали раствором PBS. Затем к нему добавляли раствор PBS, содержащий DAPI, и обеспечивали проведение реакции при комнатной температуре в течение 10 минут. Срезы ткани, обработанные, как описано выше, помещали на предметное стекло, а затем покрывали 100 мкл заливочной среды. После этого срезы ткани, обработанные, как описано выше, накрывали покровным стеклом и запечатывали.

Флуоресцентные изображения окрашенных образцов получали с помощью конфокального микроскопа. Для фотографии использовали программное обеспечение LAS-X, а интенсивность источника света отрегулировали до интенсивности УФ-излучения 4% и

мощности белого лазера 70% (488 - 15%, 568 - 10%). В данном случае для увеличения использовали 40-кратную линзу объектива, и с разрешением пикселей 284 нм получили изображения общей толщиной 20 мкм с толщиной 1 мкм на срез ткани. Кроме того, с помощью конфокального микроскопа STED получили флуоресцентные изображения окрашенных образцов сверхвысокого разрешения. Для фотографии использовали программное обеспечение LAS-X, а интенсивность источника света отрегулировали до интенсивности УФ-излучения 6% и мощности белого лазера 70% (488 - 15%, 568 - 10%). Для увеличения использовали 100-кратную линзу объектива, а также программное увеличение и функции STED. Кроме того, для фотографирования устанавливали увеличение с разрешением пикселя 50 нм и получали изображения общей толщиной 3 мкм с толщиной 100 нм на срез ткани.

После этого полученные таким образом изображения анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ и MATLAB. В качестве процесса предварительной обработки для анализа конфокальных флуоресцентных изображений и конфокальных флуоресцентных изображений STED выполняли гауссово размытие путем установки значения сигмы, равного 1,0, каждое изображение обрезали до одинакового размера и для каждого цветового канала создавали репрезентативное изображение. Чтобы увеличить соотношение сигнал/шум, использовали программный плагин ImageJ для выполнения вычитания фона с использованием алгоритма трекбола. Зеленый сигнал, который является сигналом TfR, нормализовали к гистограмме интенсивности и получали бинарное изображение с применением способа задания локального порога. Для множественных замаскированных кластеров TfR использовали функцию анализа частиц для выбора только пикселей с минимальной единицей пикселя 2500 нм<sup>2</sup> или больше с получением графика распределения по размеру кластера. Такой график распределения является репрезентативным для графика распределения TfR, наблюдаемого в 10 клетках и тканях из каждого органа в общей сложности 4 мышей C57BL/6, для в общей сложности 40 клеток на орган. Кроме того, использовали MATLAB для преобразования результатов графика распределения, полученных из ImageJ, в гистограмму, и использовали гладкую функцию для получения линии тренда гистограммы.

В результате, как показано на фиг. 23, было подтверждено, что TfR, экспрессируемые в тканях головного мозга, печени, селезенке, легких и ретикулоцитах, распределяются в виде кластеров TfR. Кроме того, как показано на фиг. 24, подтверждено, что в результате сравнения количественного распределения размера кластеров TfR, экспрессируемых в сосудах головного мозга, ретикулоцитах, легких, печени и селезенке, относительно



небольшие по размеру кластеры TfR с высокой плотностью присутствовали в сосудистой области ткани головного мозга, в отличие от в других тканей.

### **(3) Оценка характеристик кластеров TfR для каждого органа**

**А.** Оценка относительной плотности посредством оценки интенсивности флуоресценции

Для оценки характеристик кластеров TfR для каждого органа оценивали среднее значение интенсивности всех кластеров TfR по сосудам головного мозга и ретикулоцитам. Подробно, после визуализации кластеров TfR тем же способом, что и в разделе (2) экспериментального примера 1-8, замаскированные кластеры TfR извлекали в виде пикселей с минимальной единицей пикселя  $2500 \text{ nm}^2$  или больше с использованием функции анализа частиц. После этого извлеченное изображение преобразовали в изображение маски, а интенсивность зеленых сигналов в маске кластера рассчитывали с помощью MATLAB путем умножения изображения маски, полученного из ImageJ, на изображение, из которого было выполнено вычитание фона.

В результате, как показано на фиг. 25, наблюдали более высокую интенсивность зеленого сигнала в сосудах ткани головного мозга, указывая на то, что кластеры TfR в сосудах ткани головного мозга с высокой плотностью присутствовали с более высоким количеством TfR по сравнению с кластерами в ретикулоцитах.

### **В. Количественная оценка плотности посредством иммуноблоттинга и анализа изображений**

50000 клеток собирали из ткани сосудов головного мозга и ретикулоцитов мыши C57BL/6 с помощью FACS, а общие белки экстрагировали с использованием буфера RIPA. Экстрагированные белки смешивали с буфером для образца, денатурировали, загружали в гель SDS-PAGE, а затем переносили на PVDF-мембрану. После этого каждую полосу белка идентифицировали на мембране с использованием антитела к TfR в качестве первичного антитела, а интенсивность полос белка измеряли с использованием программного обеспечения Image lab (BioRad). Интенсивность полос белка TfR, измеренную в двух типах клеток, количественно определяли как число TfR на одну клетку с использованием стандартной кривой для полосы рекомбинантного TfR. Затем, чтобы рассчитать плотность TfR на одну клетку, средний диаметр и число кластеров TfR, измеренные с помощью описанного выше конфокального микроскопа STED, использовали для расчета общей площади кластеров TfR в пределах одной клетки, и количественно определенное число TfR делили на рассчитанную общую площадь для подсчета числа TfR на площадь кластера в одной клетке. Рассчитанное число TfR делили на число Авогадро и конвертировали в молярную концентрацию на площадь. В данном случае, поскольку TfR существует в виде димера, рассчитанную молярную концентрацию преобразовали в уменьшенное вдвое

значение. Предполагая, что TfR уложены в виде квадратной решетки, расстояние между TfR внутри кластера рассчитывали как расстояние от центральной точки димерного TfR до центральной точки соседнего TfR, и, как показано на фиг. 26, расстояние от центра до поверхности TfR определено для длинной и короткой осей. То есть, когда несколько TfR располагались/выравнивались в форме решетки, расстояние между рецептором и поверхностью соседнего рецептора с центром на длинной оси димера рассчитывали как минимальное (мин.) значение, а расстояние между рецептором и поверхностью соседнего рецептора с центром на короткой оси димера рассчитывали как максимальное (макс.) значение, и для оценки использовали среднее значение этих двух значений.

Результаты оценки плотности общего числа TfR в сосудах головного мозга и ретикулоцитах, а также расстояния между TfR показаны на фиг. 27 и 28. Подробно, как показано на фиг. 27, распределение плотности TfR, экспрессируемых в каждой отдельной клетке сосудов головного мозга, было статистически значимо выше, чем для TfR, экспрессируемых в ретикулоцитах. Кроме того, в результате расчета распределения межповерхностных расстояний между TfR, пересчитанных внутри кластера одной клетки, как показано на фиг. 28, наблюдалось статистически более короткое межповерхностное расстояние между TfR клеток сосудов головного мозга, чем расстояние между TfR в ретикулоцитах, как показано на фиг. 28. Другими словами, было подтверждено, что профиль экспрессии TfR внутри кластеров TfR клеток кровеносных сосудов был более плотным, чем для TfR в ретикулоцитах.

Обобщая приведенные выше экспериментальные результаты, профиль распределения специфических кластеров TfR в сосудистых областях ткани головного мозга показывает, что тетравалентный фрагмент связывания в соответствии с вариантом осуществления может влиять на взаимодействия со слитым белком, имеющим слитую структуру, в которой фрагмент связывания связан с С-концами легкой цепи и С-концами тяжелой цепи антитела. Также было подтверждено, что специфический профиль экспрессии кластеров TfR, которые индуцируют специфические взаимодействия в ткани головного мозга, может действовать как фактор, обеспечивающий проникновение через BBB и селективный захват антитела IgG1 в ткани головного мозга.

### **Экспериментальный пример 2. Оценка функциональных характеристик проникающих через BBB слитых белков F3№02-F3№41**

В данном экспериментальном примере была поставлена цель определить, может ли слитый белок, в котором фрагмент связывания со спиральной областью TfR тетравалентно связан с С-концевыми областями легкой цепи и С-концевыми областями тяжелой цепи в

антителе IgG1, быть функциональным, даже если фрагмент связывания со спиральной областью TfR модифицирован.

### **2-1. Оценка функциональных характеристик фрагмента связывания**

Функциональные характеристики фрагмента связывания проникающего через BBB слитого белка в соответствии с вариантом осуществления подлежали определению по способности связывания со спиральной областью TfR и по оценке уровня доставки в эндотелиальные клетки головного мозга человека соответственно.

#### **(1) Подтверждение связывания между спиральной областью TfR и фрагментом связывания**

Связывание между TfR и фрагментами связывания спиральной области №02, №03, №05-№25, №27, №30, №32, №33, №34, №36, №38 и №39 слитого белка, полученного в примерах выше, подтверждали при моделировании докинга. Структуры этих фрагментов связывания моделировали с использованием программы RosettaRelax, а положение, которое, как ожидается, будет взаимодействовать со спиральной областью TfR, моделировали с использованием структурной информации и термодинамических расчетов. После этого с помощью программы RosettaDocking проводили моделирование докинга, позволяющее найти наиболее стабильное положение путем случайного изменения положения фрагмента связывания и расчета взаимодействия со спиральной областью. Для каждого идентификационного номера последовательности провели 20000 вариантов моделирования, а полученные данные проанализировали на основе гомологии с исходной модельной структурой и термодинамической структурной стабильности.

В результате, как показано на фиг. 29-34, было подтверждено, что фрагменты связывания в соответствии с вариантом осуществления стабильно связываются со спиральной областью TfR.

#### **(2) Подтверждение доставки в эндотелиальные клетки головного мозга человека**

Таким же образом, как и в разделе (2) экспериментального примера 1-1, была поставлена цель определить, могут ли слитые белки, полученные в соответствии с примерами, быть доставлены в клетки hCMEC/D3, которые представляют собой эндотелиальные клетки головного мозга человека, входящие в состав BBB человека, посредством взаимодействия между TfR и фрагментами связывания спиральной области №04, №16, №19, №20, №25-№29, №31, №34-№38, №40 и №41. Между тем, в качестве контрольной группы использовали группу, которой внутривенно вводили только антитело IgG1.

В результате, как показано на фиг. 35-40, способность эффективной доставки фрагментов связывания в соответствии с вариантом осуществления в клетки была

подтверждена в результате оценки уровня доставки в клетки с использованием линии эндотелиальных клеток головного мозга человека (hCMEC/D3).

## **2-2. Оценка уровня проникновения слитого белка в BBB**

Таким же образом, как в разделе (1) экспериментального примера 1-2, оценивали уровень захвата антитела IgG1 в ткани головного мозга при внутривенном введении проникающих через BBB слитых белков F3№02-F3№42 в соответствии с вариантом осуществления через 2 или 4 дня после внутривенного введения. Между тем, в качестве контрольной группы использовали группу, которой внутривенно вводили только антитело IgG1.

В результате, как показано на фиг. 41-45, было подтверждено, что все группы с введением проникающих через BBB слитых белков F3№02-F3№24 из примеров 2-24, которые сохраняют свойства связывания в отношении спиральной области, но получены с использованием первой группы фрагментов связывания, имеющей различные аминокислотные последовательности, показали значительное увеличение уровня антител IgG1 в ткани головного мозга по сравнению с контрольной группой. Кроме того, как показано на фиг. 46-49, было подтверждено, что все группы с введением проникающих через BBB слитых белков F3№025-F3№41 из примеров 25-41, которые сохраняют по меньшей мере определенный уровень идентичности последовательности с фрагментом связывания под SEQ ID NO: 3, но получены с использованием второй группы фрагментов связывания, имеющей замену, вставку или делецию некоторых аминокислотных последовательностей, показали значительное увеличение уровня антитела IgG1 в ткани головного мозга по сравнению с контрольной группой.

Обобщая приведенные выше экспериментальные результаты, было подтверждено, что слитые белки в соответствии с вариантом осуществления проявляют такие эффекты, как высокое проникновение через BBB и высокая доставка антитела IgG1 в ткань головного мозга, как функцию, полученную на основе фрагмента с эффективной аффинностью связывания со спиральной областью TfR.

## **Экспериментальный пример 3. Оценка функциональных характеристик в зависимости от изменения валентности фрагмента связывания в проникающем через BBB слитом белке**

В данном экспериментальном примере была поставлена цель определить влияние на функциональные характеристики вышеупомянутых слитых белков изменения валентности фрагмента связывания, связанного с IgG1, в слитом белке, связанном с фрагментом связывания со спиральной областью TfR.

Подробно, таким же образом, как и в разделе (1) экспериментального примера 1-2, уровень захвата антитела IgG1 в ткани головного мозга при внутривенном введении слитых

белков оценивали через 2 или 4 дня после внутривенного введения относительно следующего: 1) слитый белок (F3), в котором фрагмент связывания со спиральной областью TfR тетравалентно связан с С-концевыми областями легкой цепи и С-концевыми областями тяжелой цепи в антителе IgG1; 2) слитый белок (F1), в котором фрагмент связывания со спиральной областью TfR двухвалентно связан с С-концевыми областями тяжелой цепи в антителе IgG1; и 3) слитый белок (F5), в котором фрагмент связывания со спиральной областью TfR двухвалентно связан с С-концевыми областями легкой цепи антитела IgG1.

В результате, как показано на фиг. 50-59, было подтверждено, что в результате количественного определения и сравнения уровня антитела IgG1 в ткани головного мозга группа, которой вводили слитый белок, в котором фрагмент связывания связан с каждой из четырех областей, включая С-концы тяжелой цепи и С-концы легкой цепи (F3№03, F3№05, F3№06, F3№12, F3№16, F3№25, F3№27, F3№31, F3№37 или F3№40), показала значительное увеличение уровня антитела IgG1 в ткани головного мозга по сравнению с группой, которой вводили слитый белок, в котором фрагмент связывания связан с двумя областями, включая С-концы тяжелой цепи (F1№03, F1№05, F1№06, F1№12, F1№16, F1№25, F1№27, F1№31, F1№37 или F1№40), или группой, которой вводили слитый белок, в котором фрагмент связывания связан с двумя областями, включая С-концы легкой цепи (F5№03, F5№05, F5№06, F5№12, F5№16, F5№25, F5№27, F5№31, F5№37 или F5№40).

Обобщая приведенные выше экспериментальные результаты, было еще раз подтверждено, что, поскольку слитый белок в соответствии с вариантом осуществления имеет структуру, которая отражает профиль распределения специфических кластеров TfR в сосудистой области ткани головного мозга, как описано выше, могут проявляться уникальные функциональные характеристики, когда фрагмент, обладающий эффективной аффинностью связывания со спиральной областью TfR, тетравалентно связан с концом антитела IgG1.

#### **Экспериментальный пример 4. Оценка реакционной способности антитела IgG1 по связыванию фрагмента связывания**

В данном экспериментальном примере была поставлена цель определить в слитом белке, в котором фрагмент связывания со спиральной областью TfR связан тетравалентно, влияние связи с фрагментом связывания на реакционную способность, т. е. способность связывания с мишенью, у антитела IgG1.

Подробно, 100 мкл человеческого белка PD-L1 с концентрацией 0,25 мкг/мл добавляли в 96-луночный планшет и белок наносили на планшет при 4°C на 16 часов. После этого покрытый планшет четыре раза промывали с помощью PBS-T, добавляли 200 мкл блокирующего буфера с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение

2 часов для предотвращения неспецифического связывания антитела. После этого планшет четыре раза промывали с помощью PBS-T, а затем в лунку добавляли 4 нМ слитых белков (F3.№01 и F3'.№01) и снова инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После этого в лунку, содержащую каждый образец, добавляли 100 мкл выявляющего антитела, конъюгированного с HRP FC $\gamma$  к IgG человека, и затем инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого инкубированный планшет четыре раза промывали с помощью PBS-T, а затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл ТМВ и обеспечивали проведение реакции при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого добавляли 100 мкл стоп-раствора, чтобы остановить реакцию, и измеряли поглощение каждой лунки при длине волны 450 нм с помощью устройства для считывания микропланшетов. Между тем, в данном экспериментальном примере использовали антитело к PD-L1 в качестве антитела IgG1, использовали фрагмент связывания спиральной области №01 для TfR и в качестве контрольной группы использовали группу, в которой добавляли только антитело IgG1.

В результате, как показано в таблице 2 и на фиг. 60, было подтверждено, что слитые белки F3.№01 и F3'.№01 в соответствии с вариантом осуществления демонстрируют сходные уровни реакционной способности антитела IgG1, т. е. способности связывания с PD-L1, как и контрольная группа. Приведенные выше результаты позволяют предположить, что эффекты проникновения через BBB и селективной доставки слитого белка в ткань головного мозга в соответствии с вариантом осуществления проявляются при сохранении биологической активности, присущей антителу IgG.

[Таблица 2]

	<b>Контроль 1</b>	<b>Контроль 2</b>	<b>F3.№01</b>	<b>F3'.№01</b>
<b>Низ</b>	0,07391	0,1006	0,1029	0,09810
<b>Верх</b>	3,521	3,493	3,457	3,420
<b>Наклон</b>	1,263	1,230	1,315	1,230
<b>EC<sub>50</sub> (нМ)</b>	0,01961	0,02113	0,02610	0,02585
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9994	0,9974	0,9993	0,9990

**Экспериментальный пример 5. Оценка применимости с различными антителами**

**IgG1**

В данном экспериментальном примере была поставлена цель определить, может ли слитый белок, в котором фрагмент связывания со спиральной областью TfR тетравалентно связан с С-концевыми областями легкой цепи и С-концевыми областями тяжелой цепи в антителе IgG1, быть функциональным, даже если антитело IgG1 модифицировано.

**5-1. Антитело IgG1 к tau**

Из слитых белков (F3), в которых фрагмент связывания со спиральной областью TfR тетравалентно связан с С-концевыми областями легкой цепи и С-концевыми областями тяжелой цепи в антителе IgG1, антитело IgG1 (антитело к Тау), связывающееся с Тау, использовали в качестве антитела IgG1, и фрагмент связывания №25, №27 или №36 использовали в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR, чтобы получить проникающий через BBB слитый белок (F3№25-Тау, F3№27-Тау или F3№36-Тау) таким же образом, как в примере 1. После этого уровень захвата антитела IgG1 в ISF при внутривенном введении полученного слитого белка оценивали таким же образом, как в разделе (2) экспериментального примера 1-2. Между тем, в качестве контрольной группы использовали группу, в которой добавляли только антитело IgG1.

В результате, как показано на фиг. 61 и 62, было подтверждено, что уровень антитела IgG1 к Тау в ISF был повышен по сравнению с контрольной группой, даже когда тип антитела IgG1, которое является партнером по слиянию фрагмента связывания со спиральной областью TfR, меняли на антитело IgG1 к Тау при сохранении вышеупомянутой функциональной структуры.

### **5-2. Антитело IgG1 к PD1**

Из слитых белков (F3), в которых фрагмент связывания со спиральной областью TfR тетравалентно связан с С-концевыми областями легкой цепи и С-концевыми областями тяжелой цепи в антителе IgG1, антитело IgG1 (антитело к PD1), связывающееся с PD1, использовали в качестве антитела IgG1, и фрагмент связывания №25 использовали в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR, чтобы получить проникающий через BBB слитый белок (F3№25-PD1) таким же образом, как в примере 1. После этого уровень захвата антитела IgG1 в ткани головного мозга при внутривенном введении полученного слитого белка оценивали таким же образом, как в разделе (1) экспериментального примера 1-2. Между тем, в качестве контрольной группы использовали группу, в которой добавляли только антитело IgG1.

В результате, как показано на фиг. 63, было подтверждено, что уровень антитела IgG1 к PD1 в ткани головного мозга был повышен по сравнению с контрольной группой, даже когда тип антитела IgG1, которое является партнером по слиянию фрагмента связывания со спиральной областью TfR, меняли на антитело IgG1 к PD1 при сохранении вышеупомянутой функциональной структуры.

### **5-3. Антитело IgG1 к HER2**

Из слитых белков (F3), в которых фрагмент связывания со спиральной областью TfR тетравалентно связан с С-концевыми областями легкой цепи и С-концевыми областями тяжелой цепи в антителе IgG1, антитело IgG1 (антитело к HER2), связывающееся с HER2,

использовали в качестве антитела IgG1, и фрагмент связывания №25 использовали в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR, чтобы получить проникающий через BBB слитый белок (F3№25-HER2) таким же образом, как в примере 1. После этого уровень захвата антитела IgG1 в ткани головного мозга при внутривенном введении полученного слитого белка оценивали таким же образом, как в разделе (1) экспериментального примера 1-2. Между тем, в качестве контрольной группы использовали группу, в которой добавляли только антитело IgG1.

В результате, как показано на фиг. 64, было подтверждено, что уровень антитела IgG1 к HER2 в ткани головного мозга был повышен по сравнению с контрольной группой, даже когда тип антитела IgG1, которое является партнером по слиянию фрагмента связывания со спиральной областью TfR, меняли на антитело IgG1 к HER2 при сохранении вышеупомянутой функциональной структуры.

#### **5-4. Антитело IgG1 к A $\beta$**

Из слитых белков (F3), в которых фрагмент связывания со спиральной областью TfR тетравалентно связан с С-концевыми областями легкой цепи и С-концевыми областями тяжелой цепи в антителе IgG1, антитело IgG1 (антитело к A $\beta$ ), связывающееся с A $\beta$ , использовали в качестве антитела IgG1, и фрагмент связывания №25 использовали в качестве фрагмента связывания со спиральной областью TfR, чтобы получить проникающий через BBB слитый белок (F3№25-A $\beta$ ) таким же образом, как в примере 1. После этого уровень захвата антитела IgG1 в ткани головного мозга при внутривенном введении полученного слитого белка оценивали таким же образом, как в разделе (1) экспериментального примера 1-2. Между тем, в качестве контрольной группы использовали группу, в которой добавляли только антитело IgG1.

В результате, как показано на фиг. 65, было подтверждено, что уровень антитела IgG1 к A $\beta$  в ткани головного мозга был повышен по сравнению с контрольной группой, даже когда тип антитела IgG1, которое является партнером по слиянию фрагмента связывания со спиральной областью TfR, меняли на антитело IgG1 к A $\beta$  при сохранении вышеупомянутой функциональной структуры.

Из приведенных выше результатов, касающихся функции, полученной на основе фрагмента с сильной аффинностью связывания со спиральной областью TfR, и функциональной структуры, включающей тетравалентный фрагмент, было подтверждено, что слитый белок в соответствии с вариантом осуществления проявляет такие эффекты, как высокое проникновение через BBB и высокий уровень доставки антитела IgG1 в ткань головного мозга независимо от типа антитела IgG1.

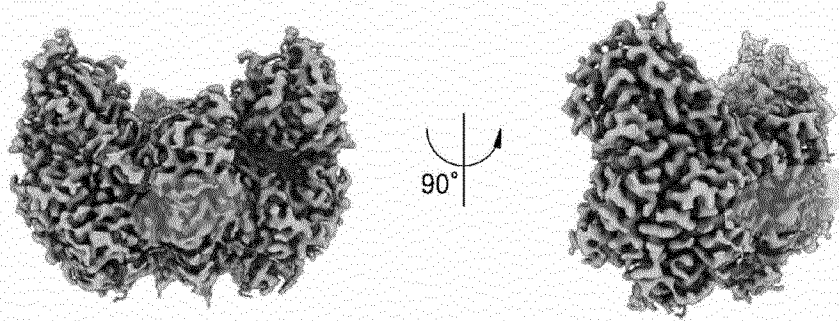


Вышеизложенные описания предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения, и для человека, обладающего обычными навыками в данной области, к которой относится настоящее изобретение, будет очевидно, что раскрытые в данном документе варианты осуществления могут быть легко модифицированы в другие конкретные формы без изменения технического смысла или существенных признаков. Следовательно, следует понимать, что описанные в данном документе примеры являются иллюстративными во всех отношениях и не ограничивающими.

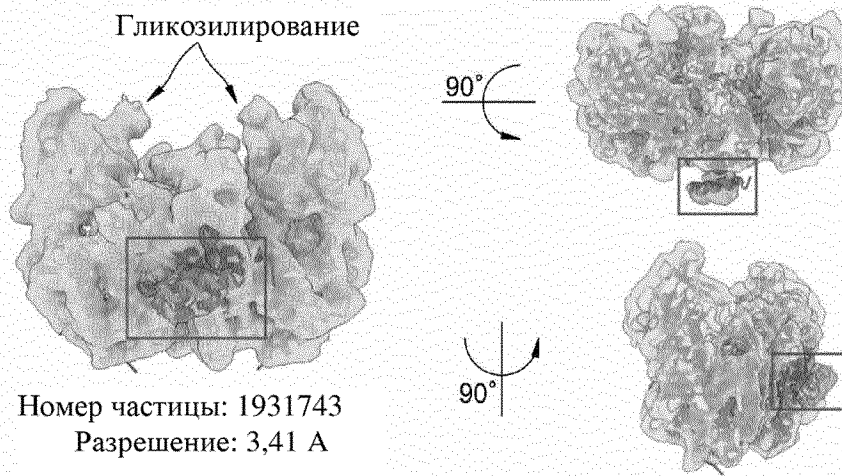
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Проникающий через гематоэнцефалический барьер слитый белок, содержащий: антитело IgG и тетравалентный фрагмент связывания со спиральной областью рецептора трансферрина (TfR), связанный с С-концевой областью легкой цепи и С-концевой областью тяжелой цепи антитела IgG.
2. Слитый белок по п. 1, где проникающий через гематоэнцефалический барьер слитый белок образует комплекс путем связывания с TfR, который образует кластеры TfR, специфически распределенные в кровеносных сосудах гематоэнцефалического барьера.
3. Слитый белок по п. 1, где проникающий через гематоэнцефалический барьер слитый белок селективно доставляется в ткань головного мозга.
4. Слитый белок по п. 1, где фрагмент связывания обладает аффинностью связывания в отношении по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из спиральной области с SEQ ID NO: 2, в TfR.
5. Слитый белок по п. 1, где множество фрагментов связывания являются одинаковыми или отличаются друг от друга.
6. Слитый белок по п. 1, где антитело IgG представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
7. Слитый белок по п. 1, где фрагмент связывания связан через линкерные пептиды с С-концевой областью легкой цепи и С-концевой областью тяжелой цепи антитела IgG.
8. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 1-7.
9. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 8.
10. Клеточная линия трансфекции, трансфицированная с помощью вектора по п. 9.

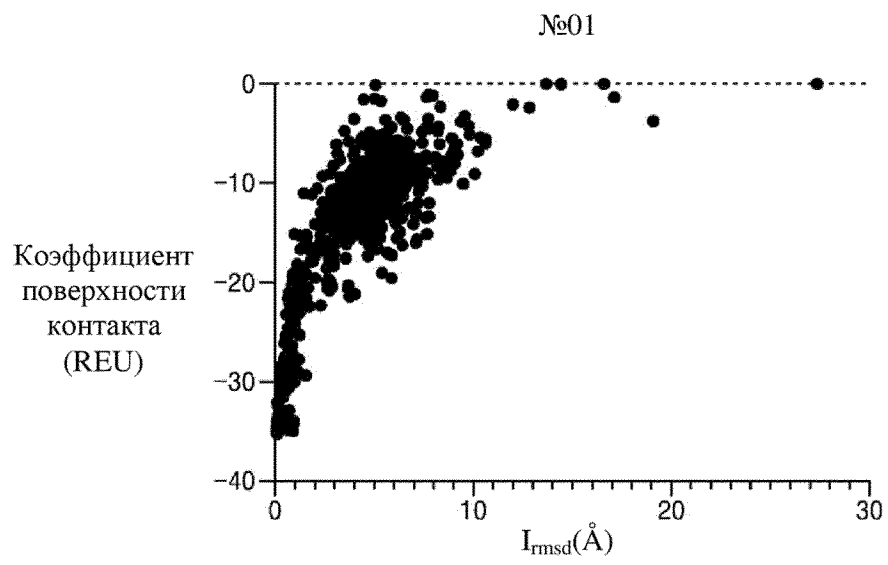
**ФИГ. 1**



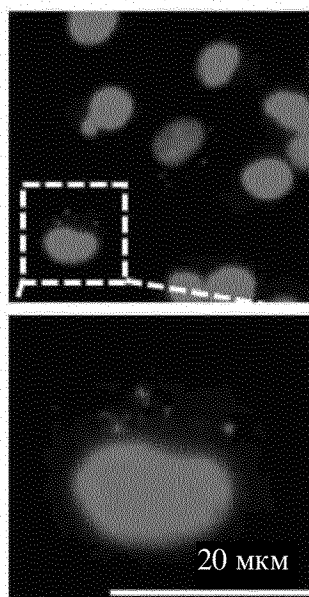
**ФИГ. 2**



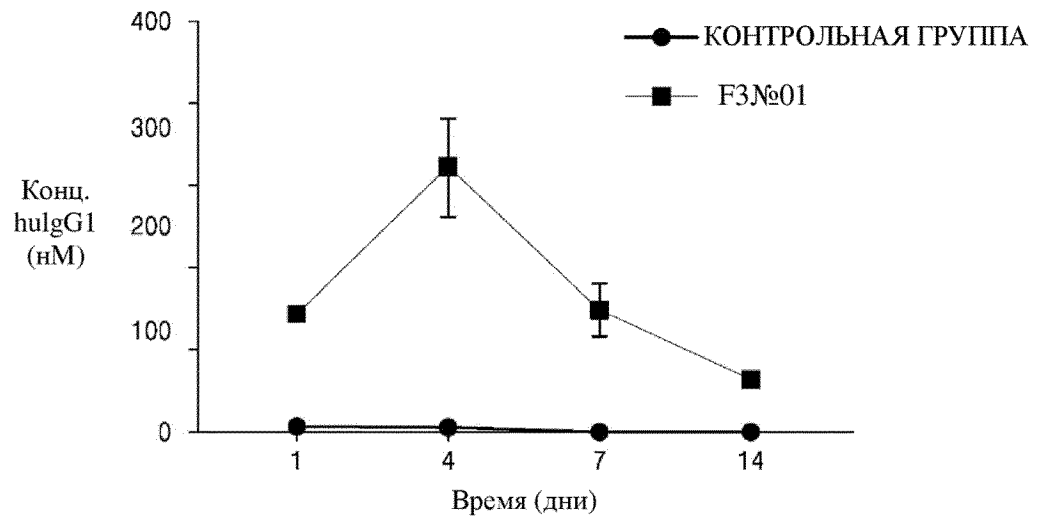
ФИГ. 3



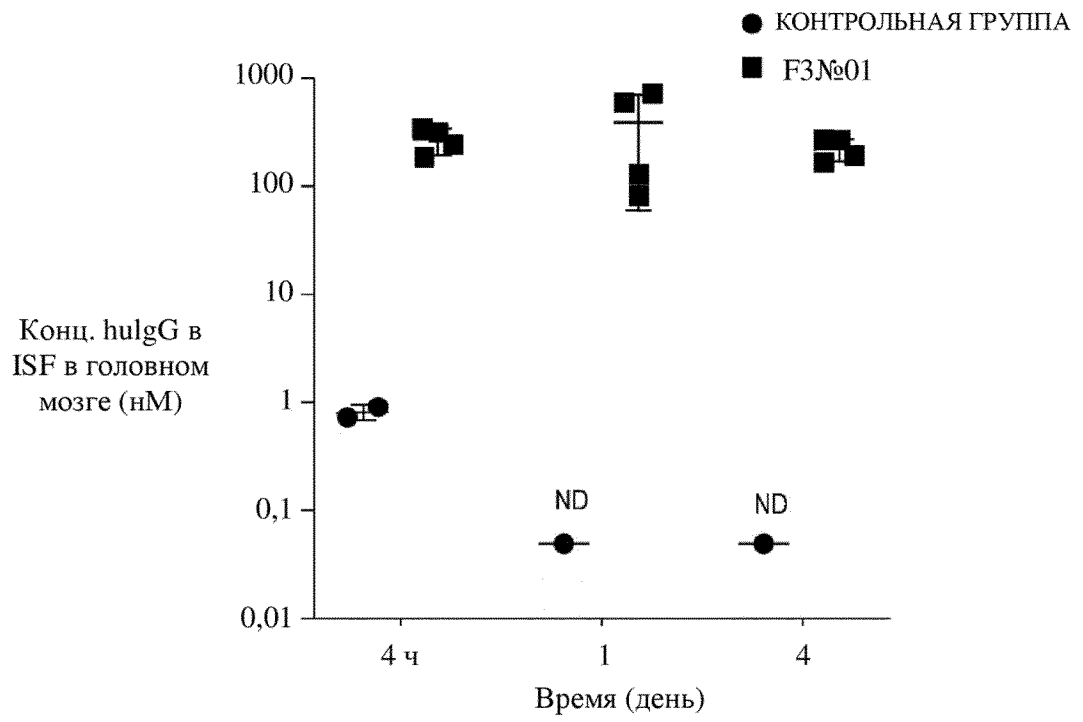
ФИГ. 4



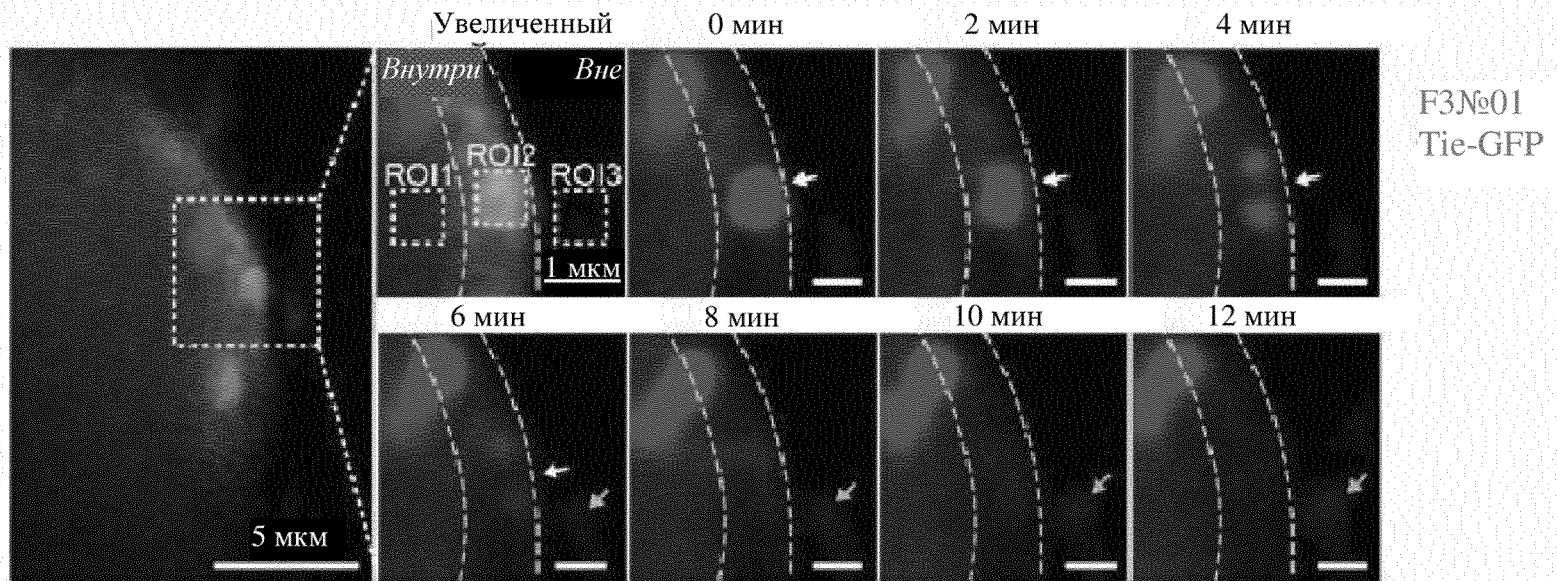
ФИГ. 5



ФИГ. 6

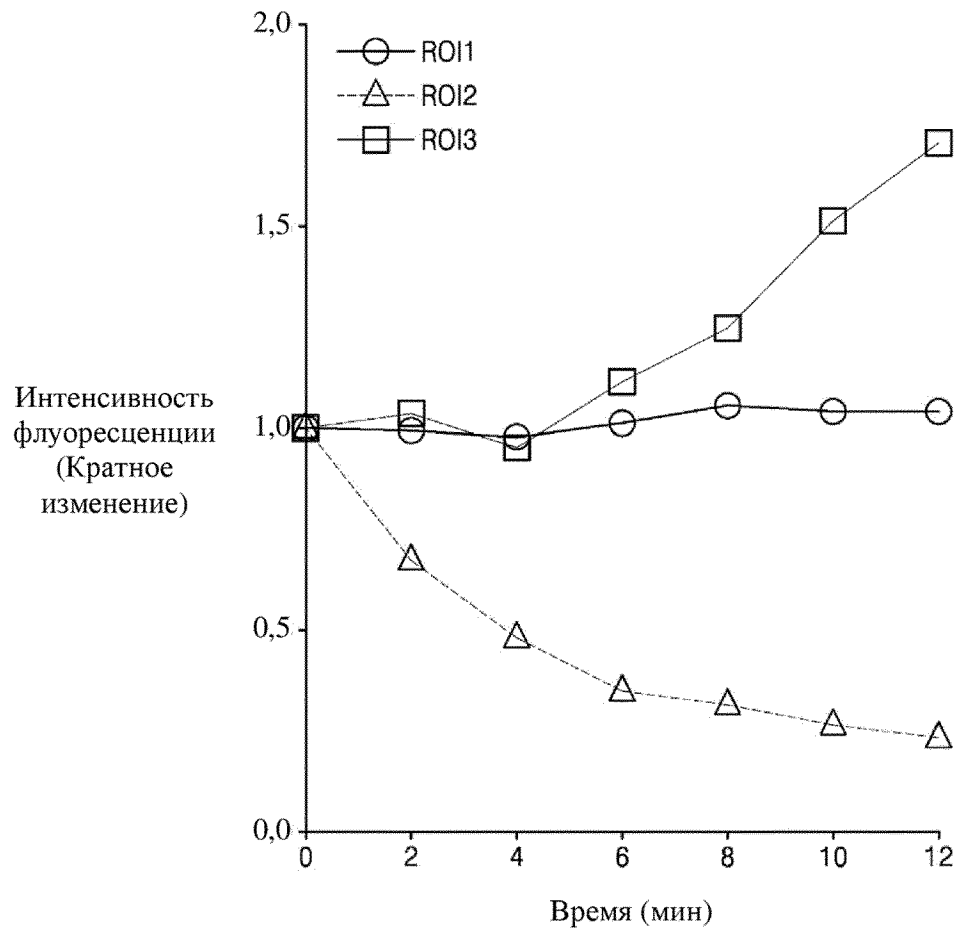


ФИГ. 7

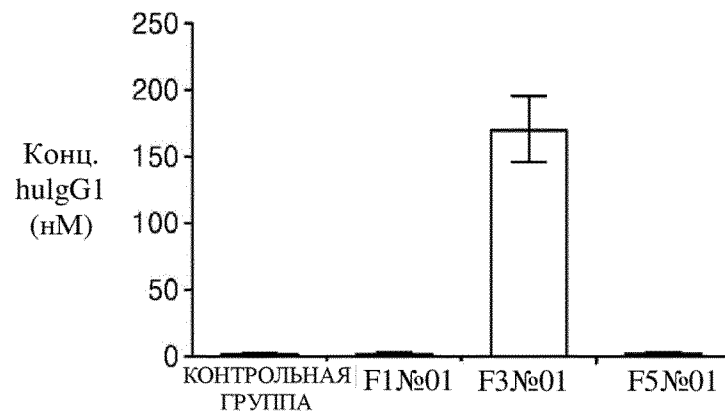




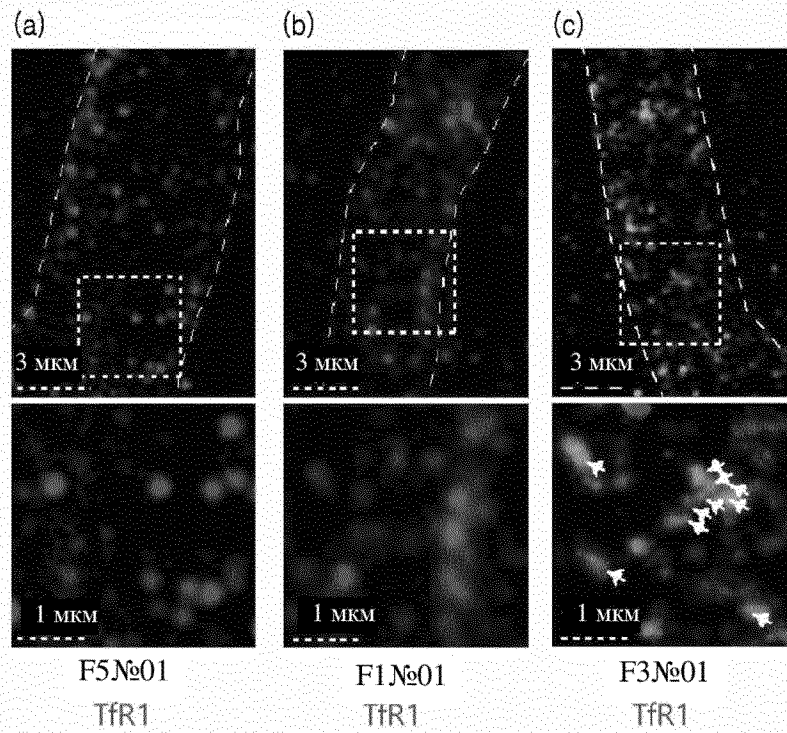
ФИГ. 8



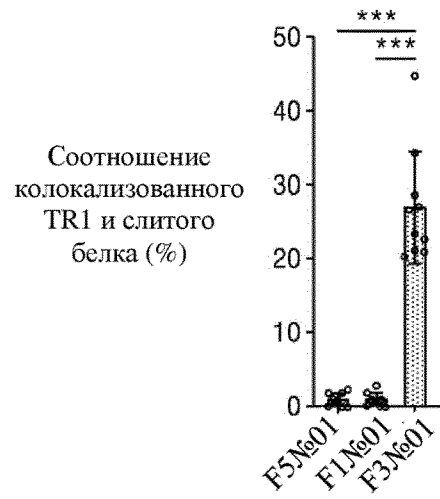
ФИГ. 9



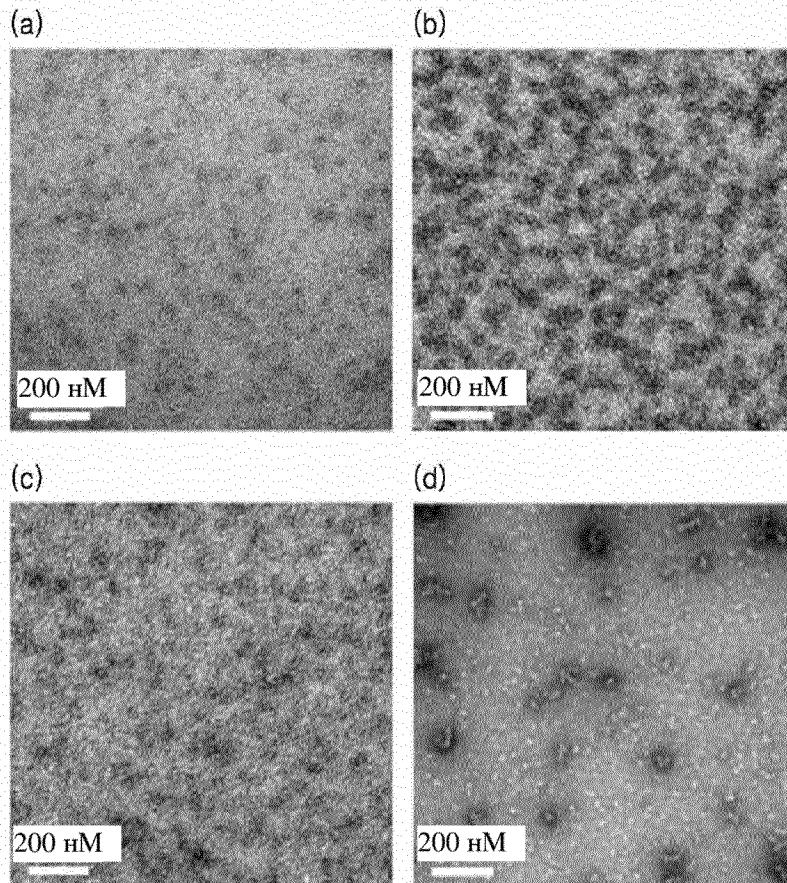
ФИГ. 10



ФИГ. 11

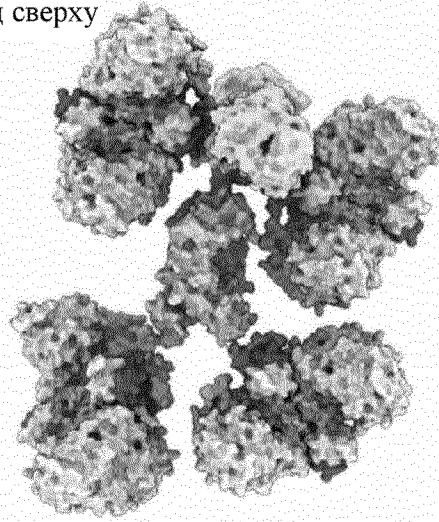


ФИГ. 12

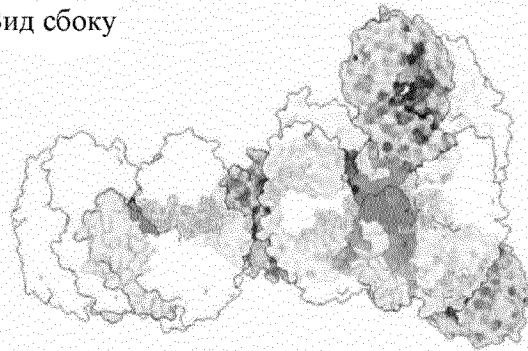


**ФИГ. 13**

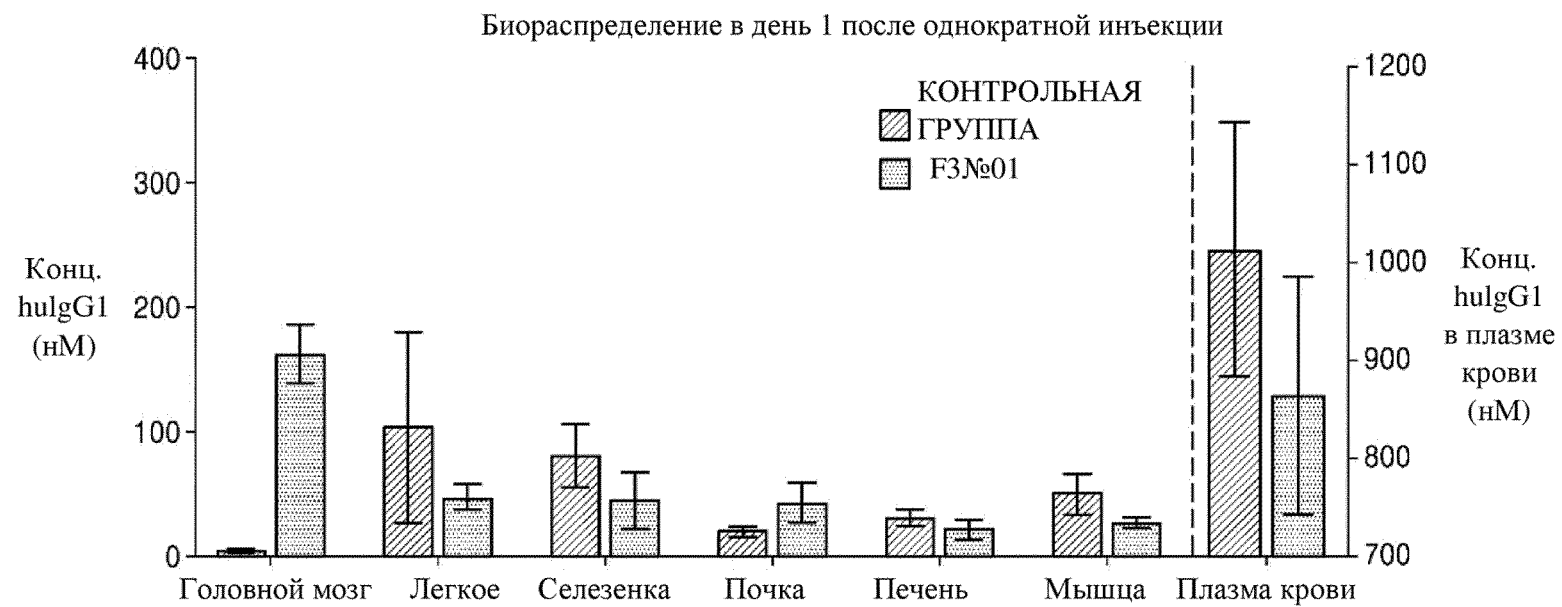
Вид сверху



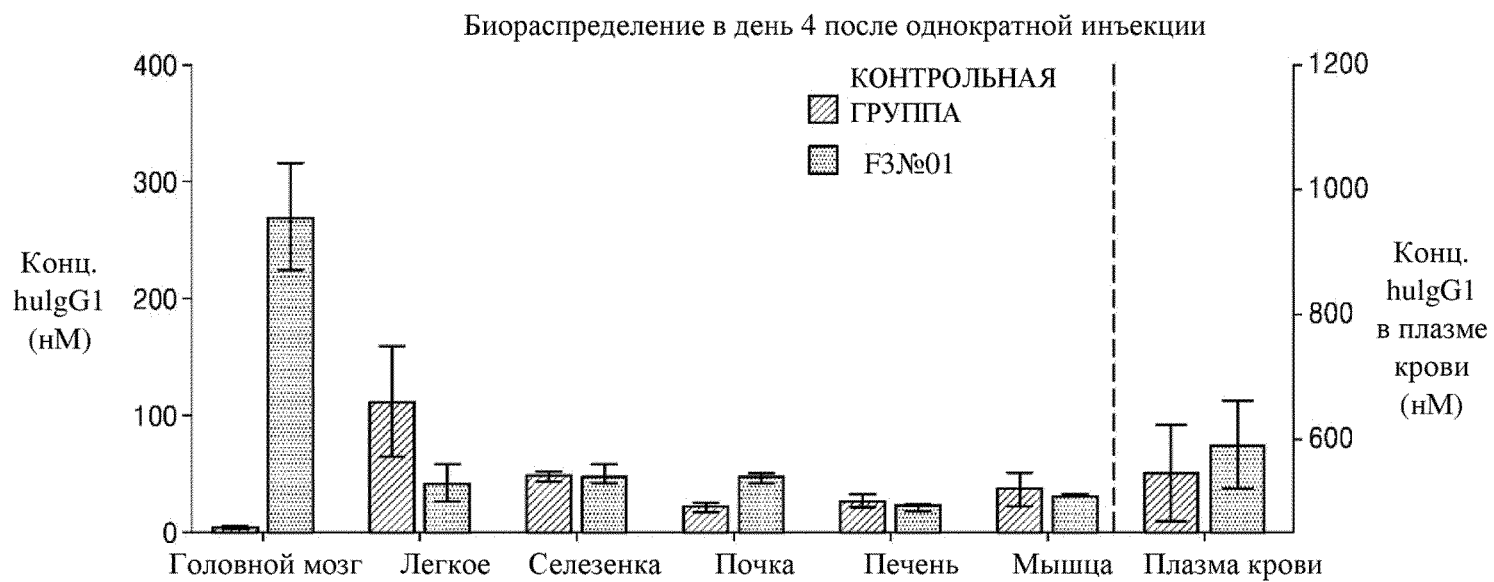
Вид сбоку



ФИГ. 14

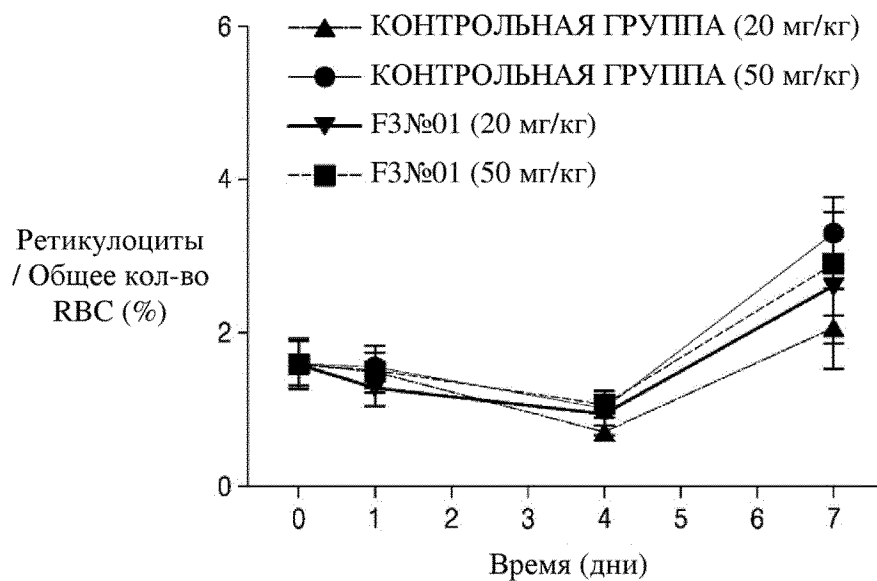


**ФИГ. 15**

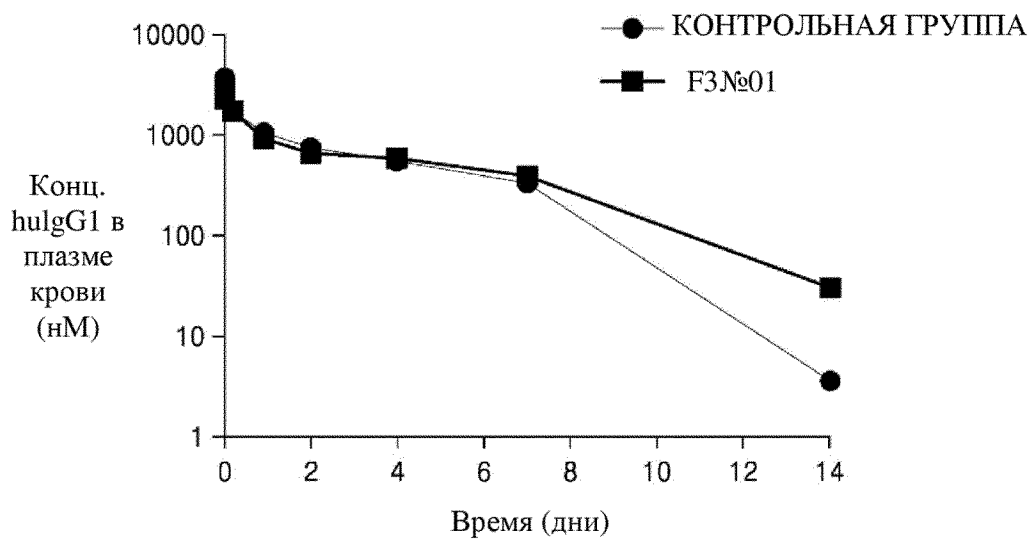




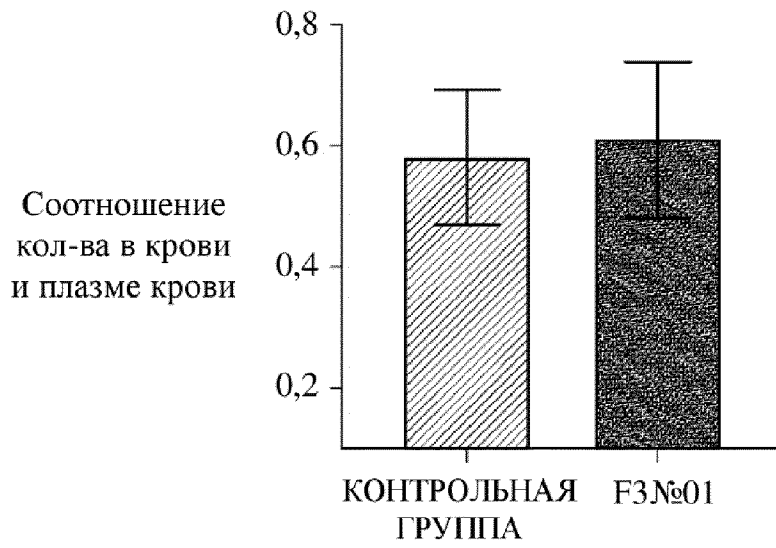
ФИГ. 16



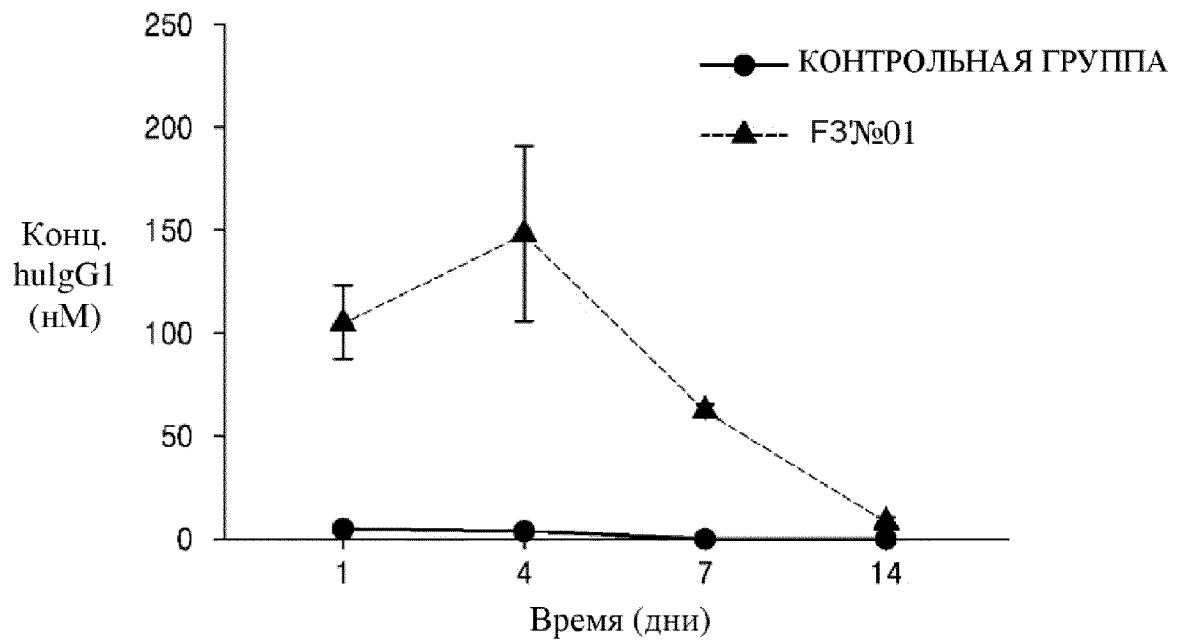
ФИГ. 17



ФИГ. 18

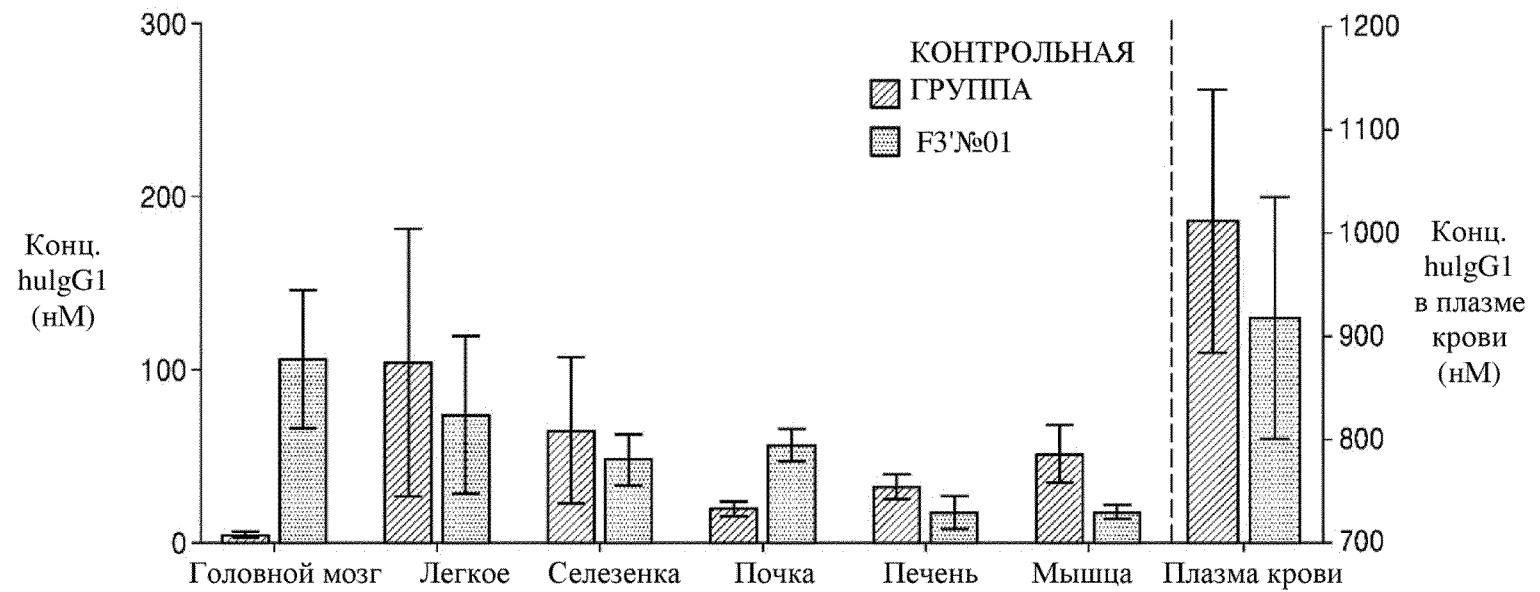


ФИГ. 19

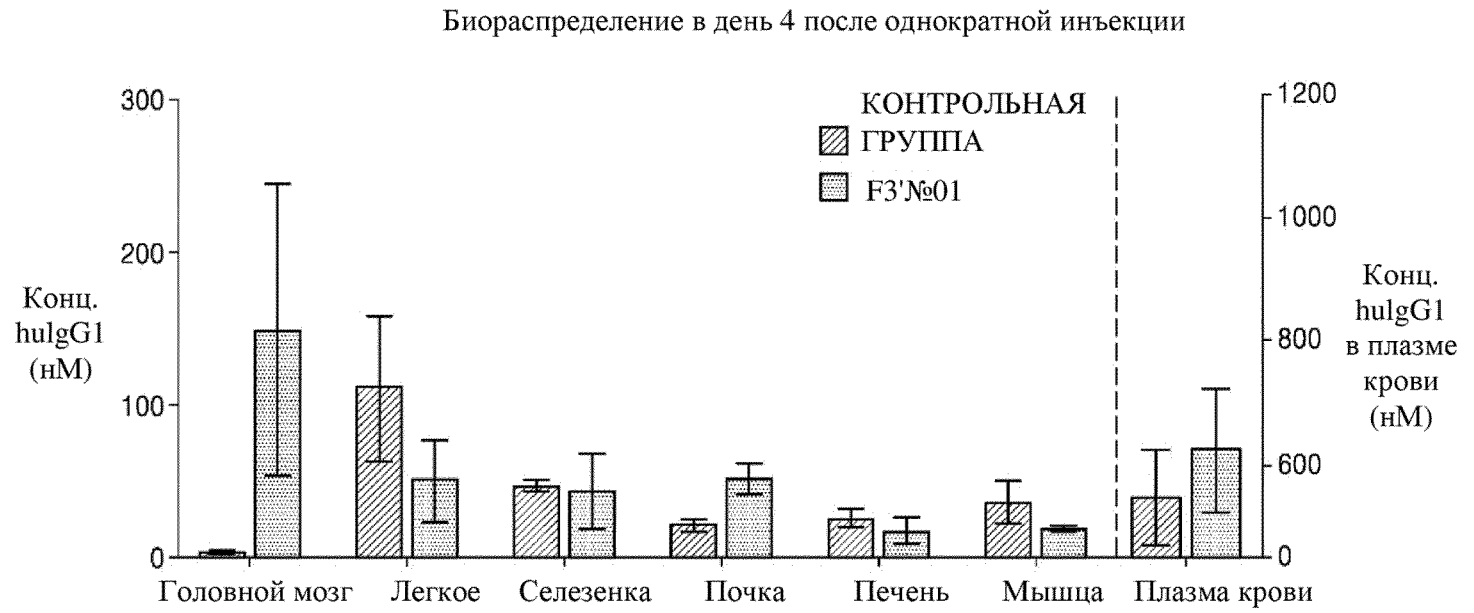


ФИГ. 20

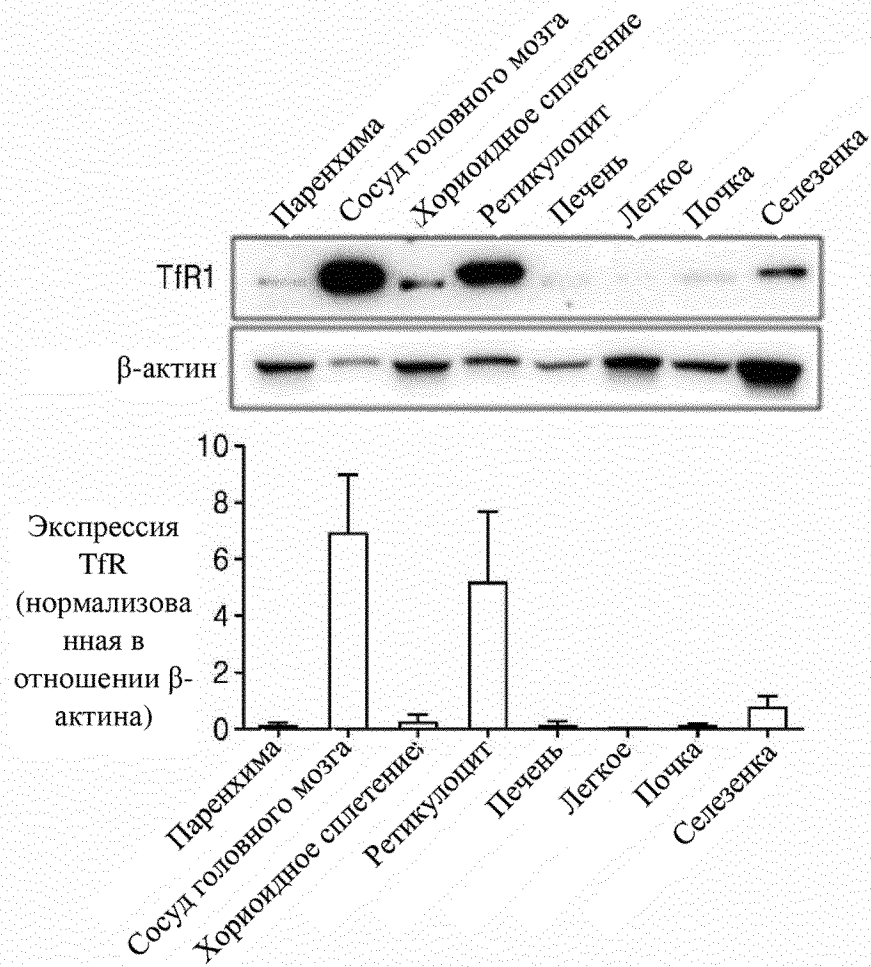
Биораспределение в день 1 после однократной инъекции



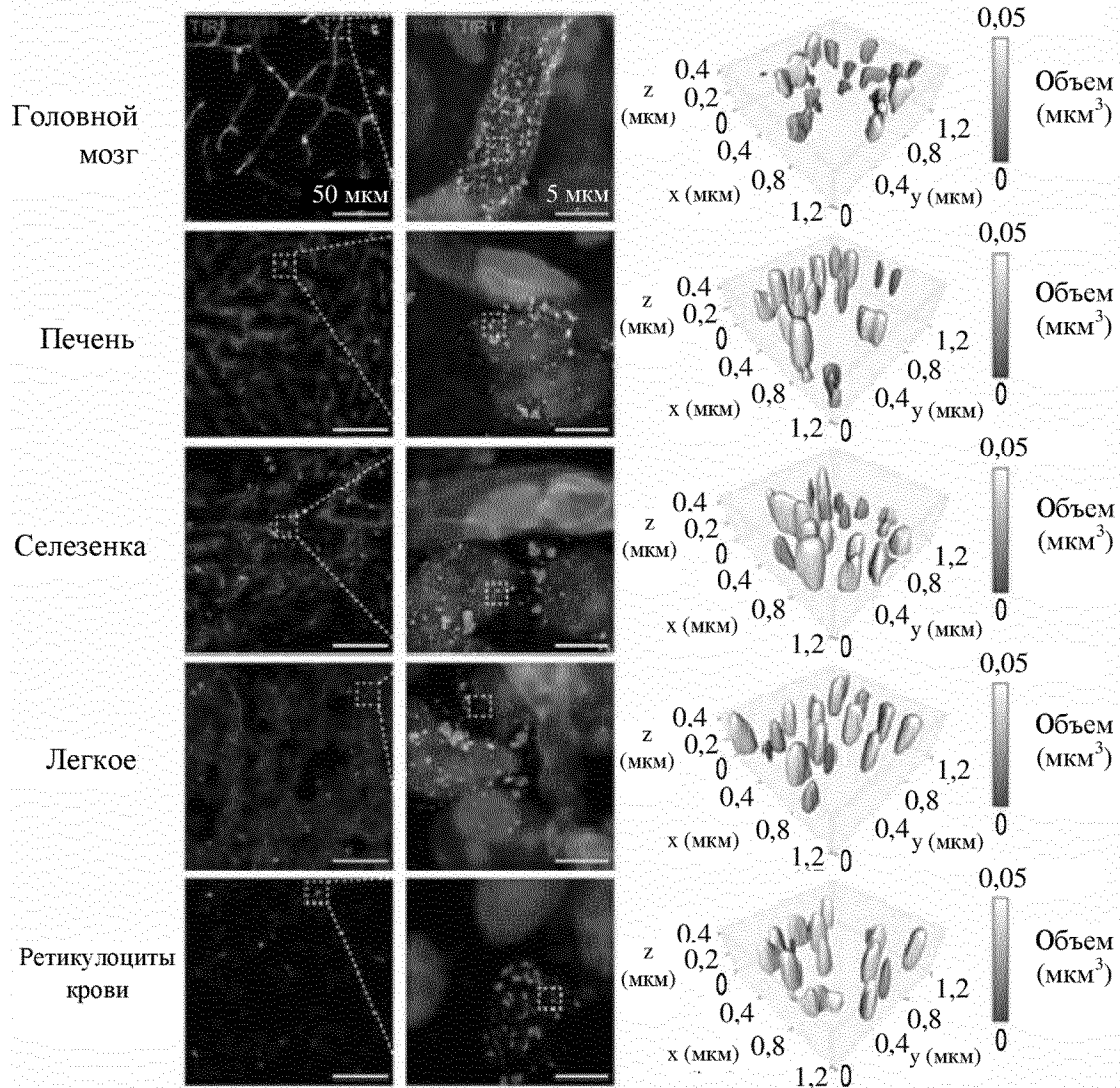
ФИГ. 21



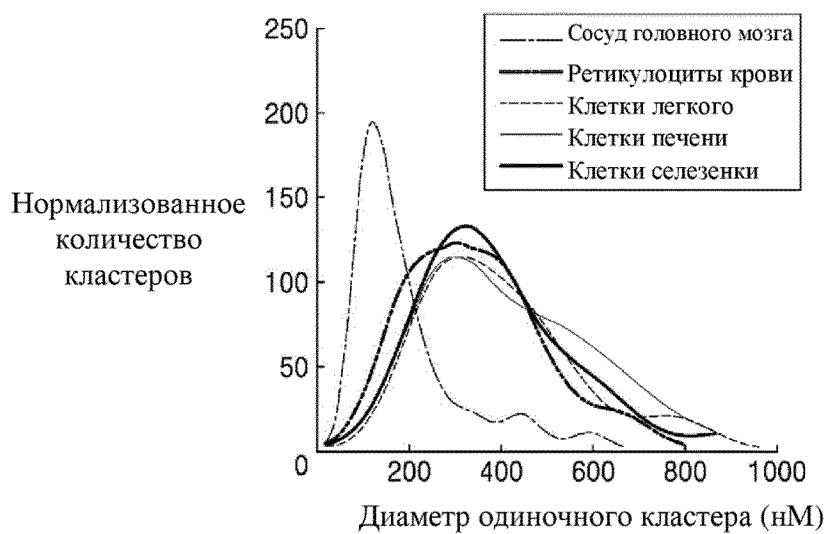
ФИГ. 22



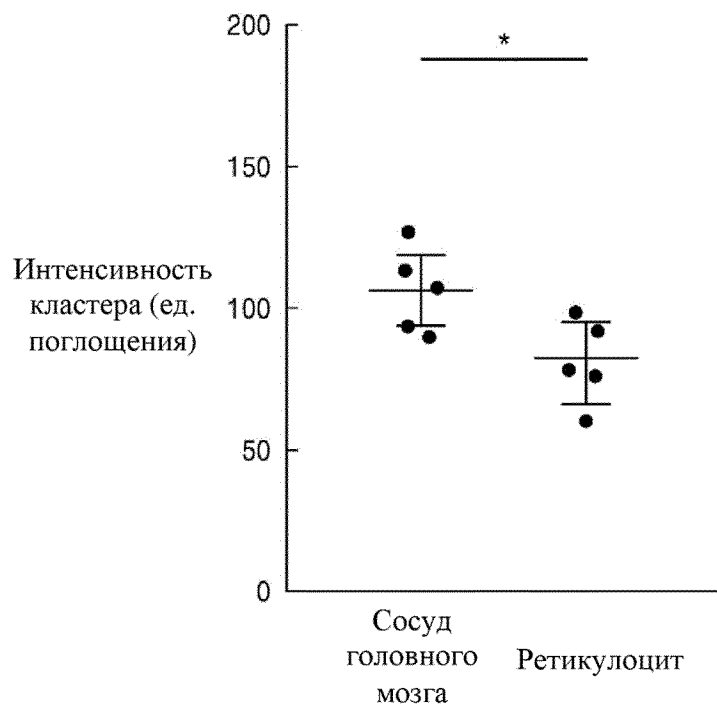
ФИГ. 23



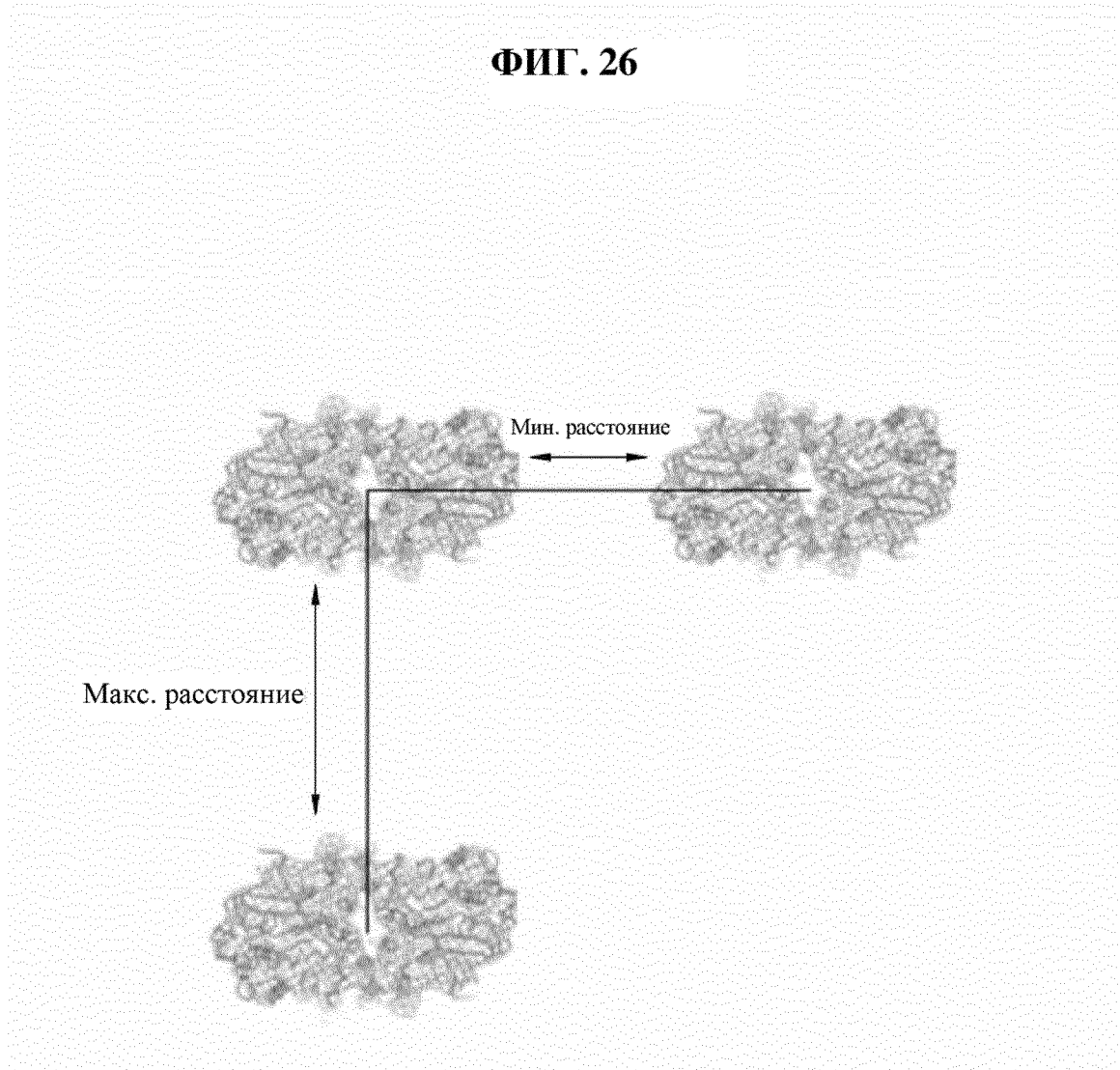
ФИГ. 24



ФИГ. 25

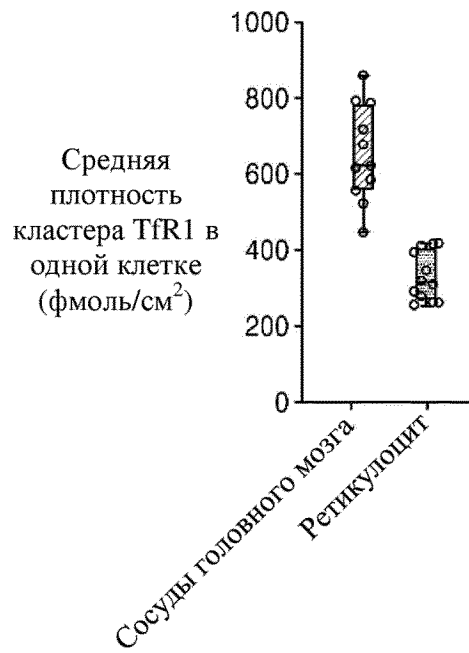


ФИГ. 26

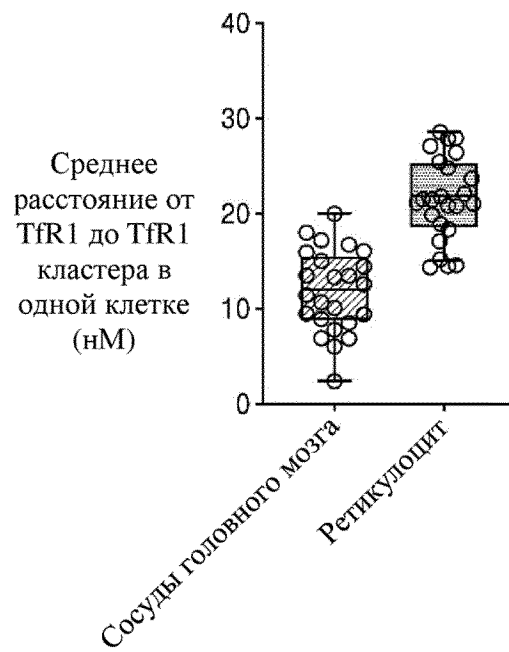




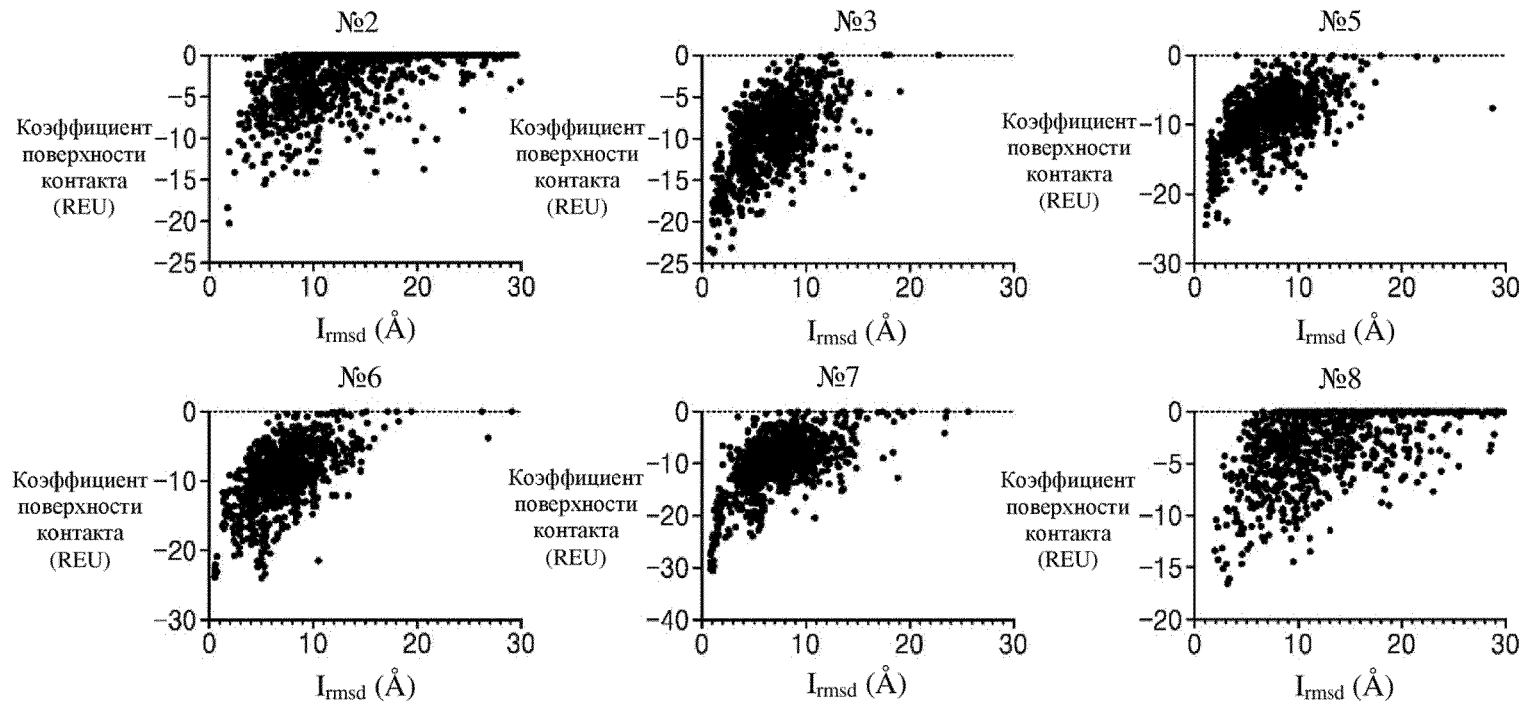
ФИГ. 27



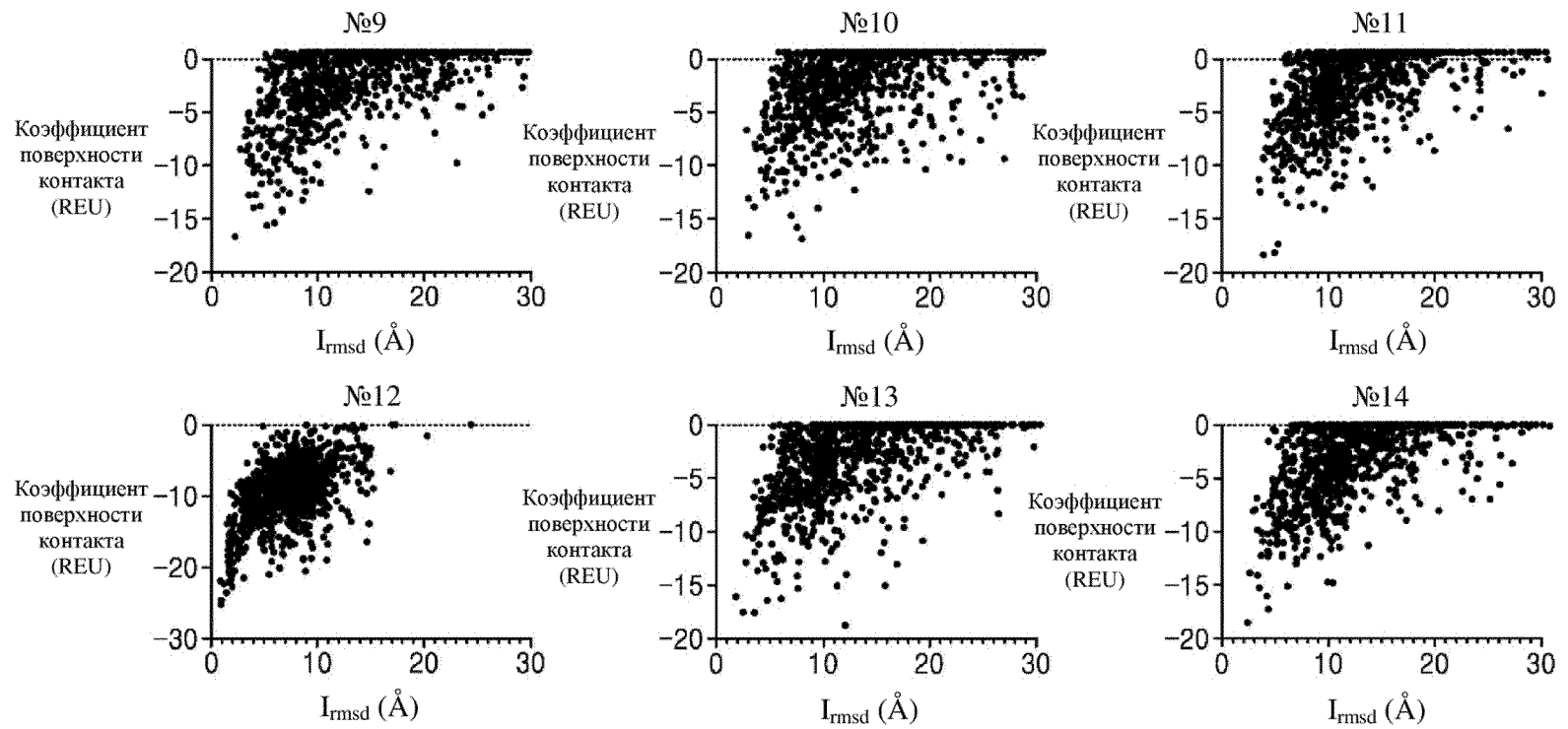
ФИГ. 28



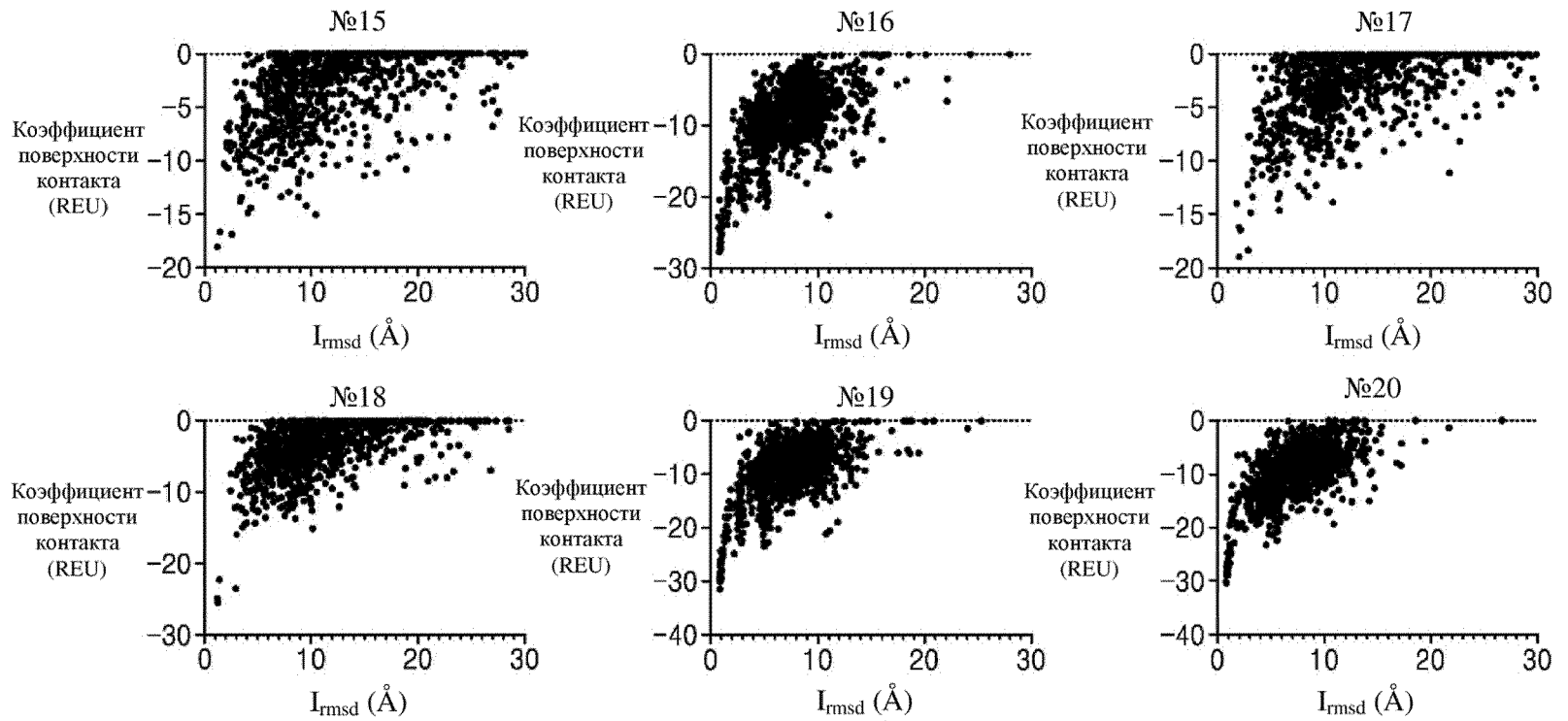
ФИГ. 29



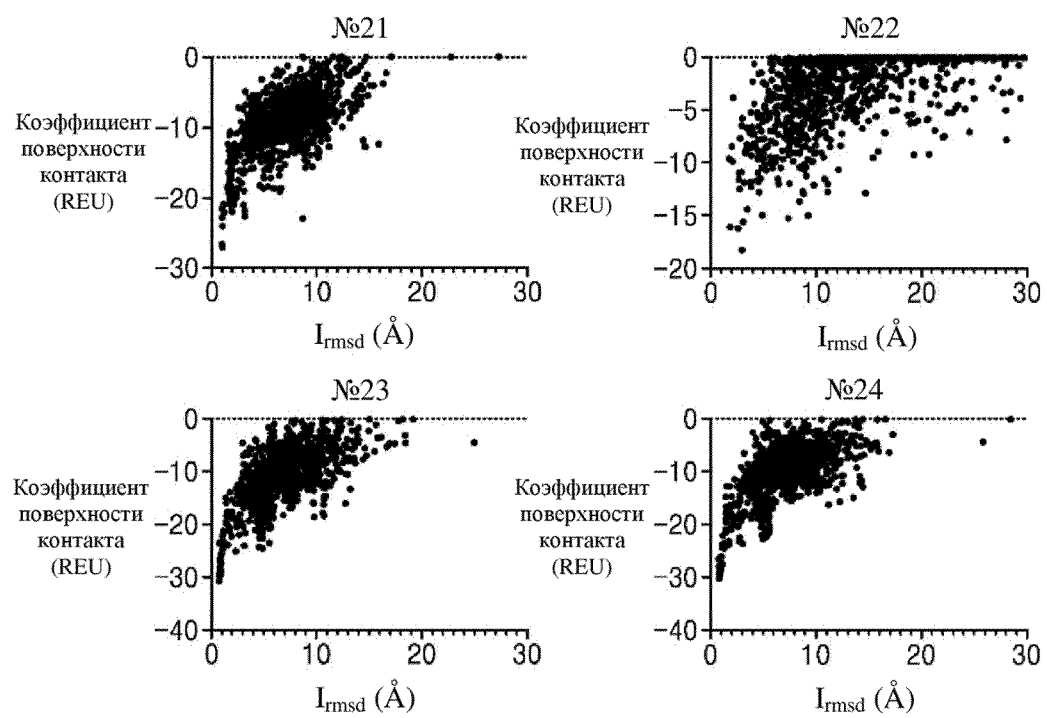
ФИГ. 30



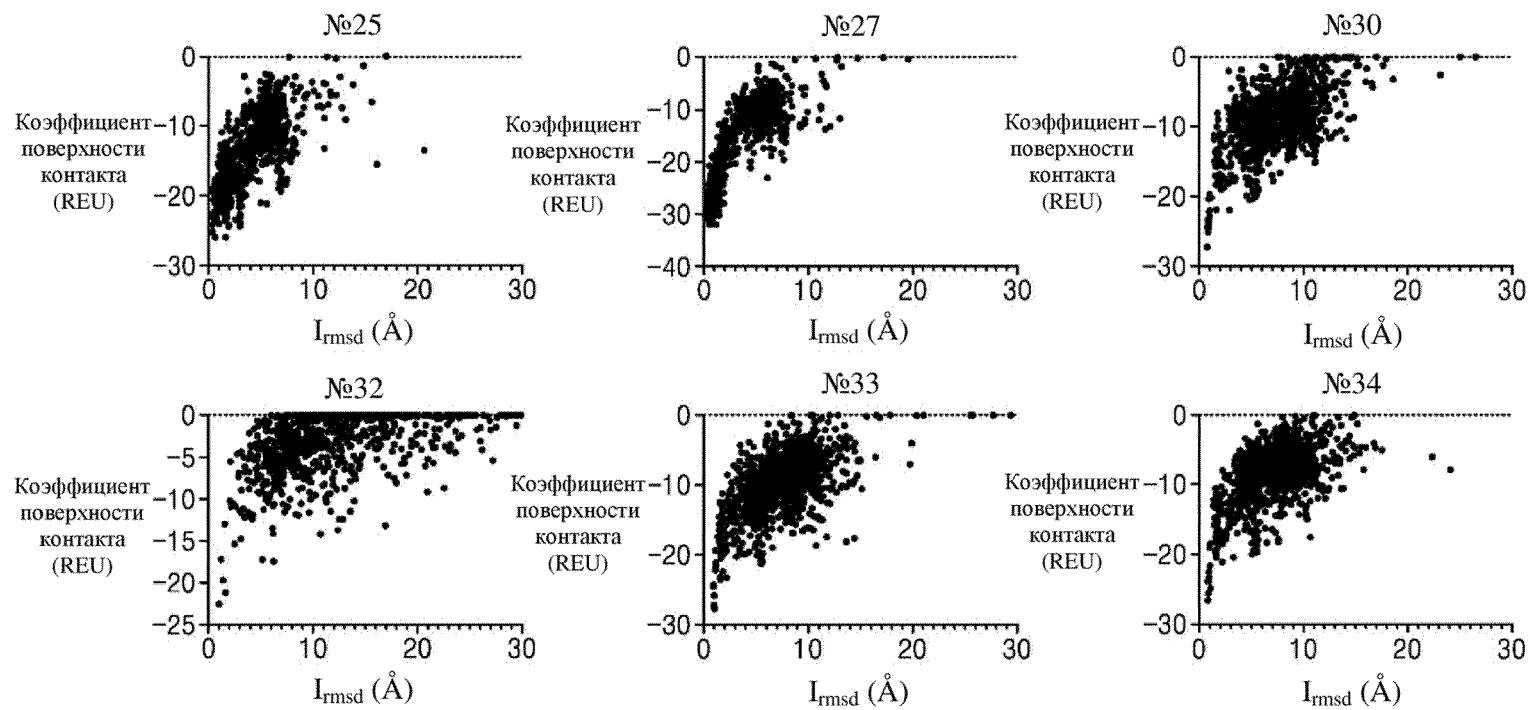
ФИГ. 31



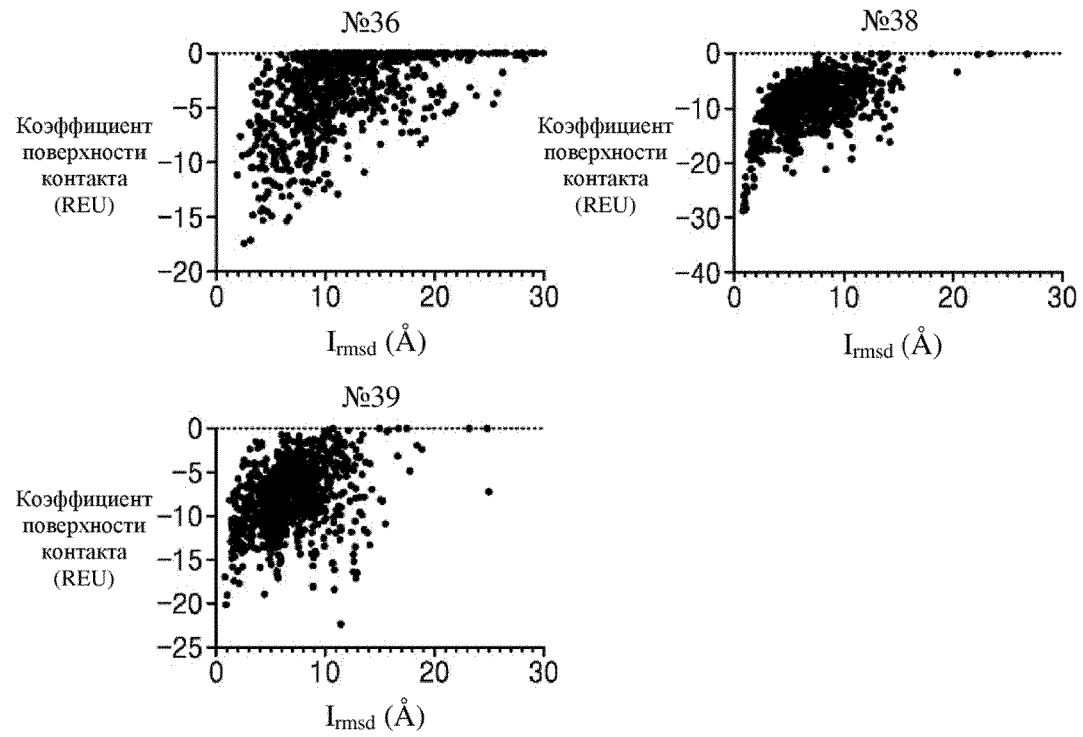
ФИГ. 32



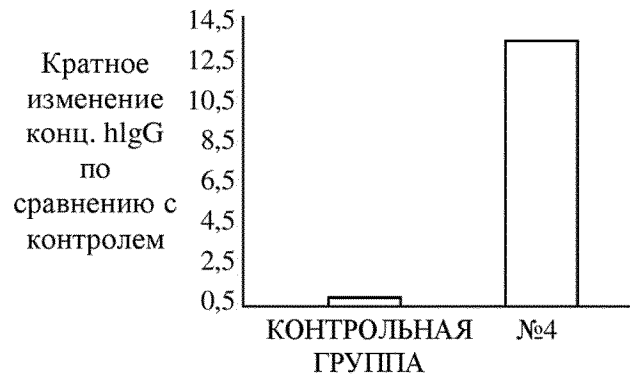
ФИГ. 33



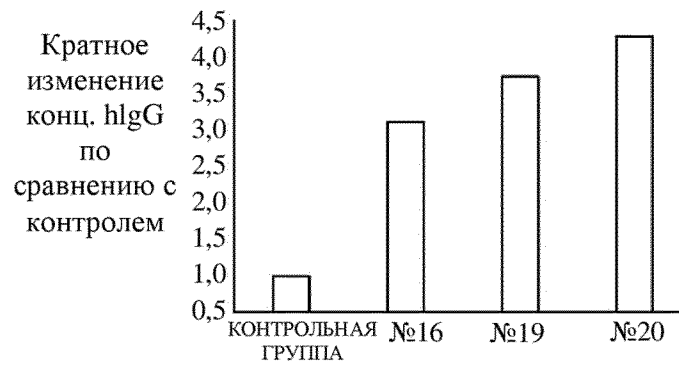
ФИГ. 34



ФИГ. 35

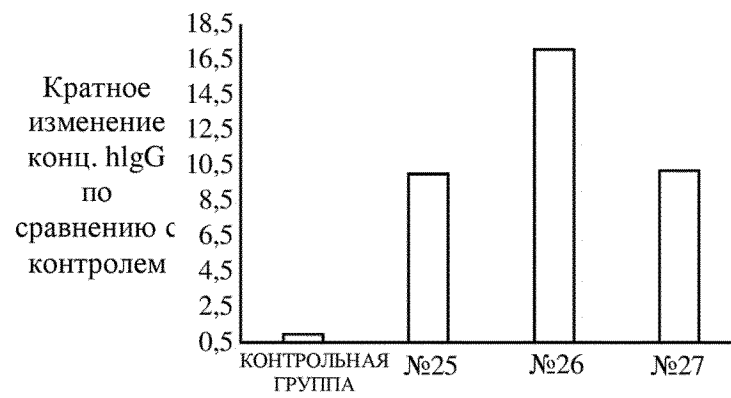


ФИГ. 36

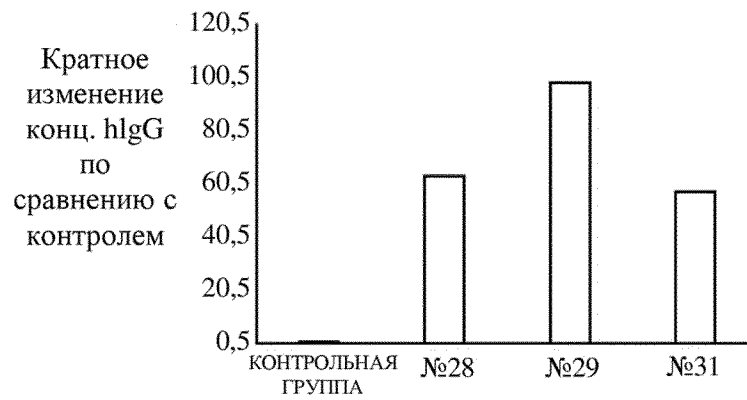




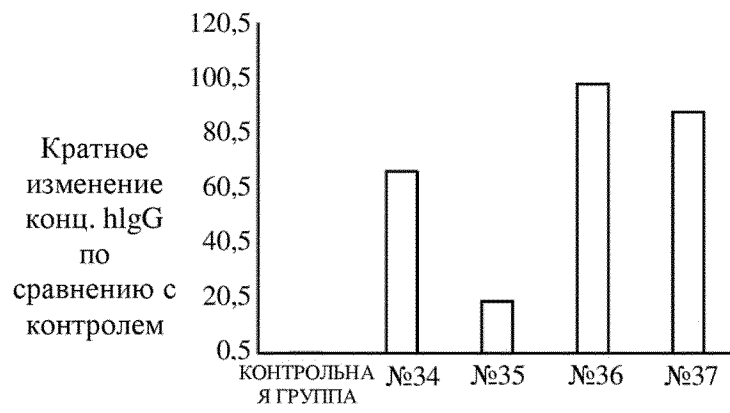
ФИГ. 37



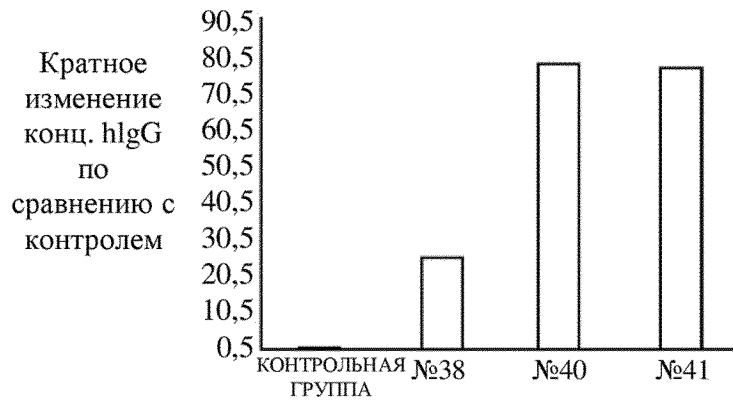
ФИГ. 38



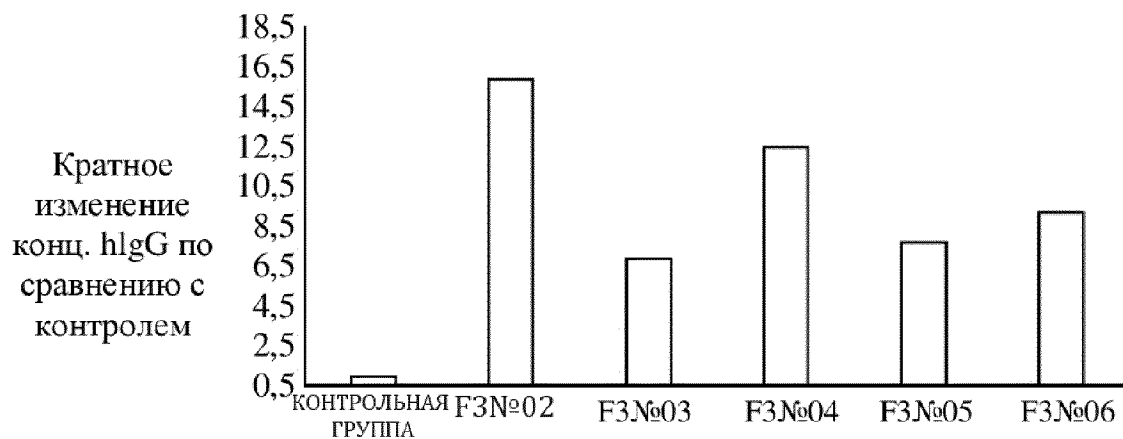
ФИГ. 39



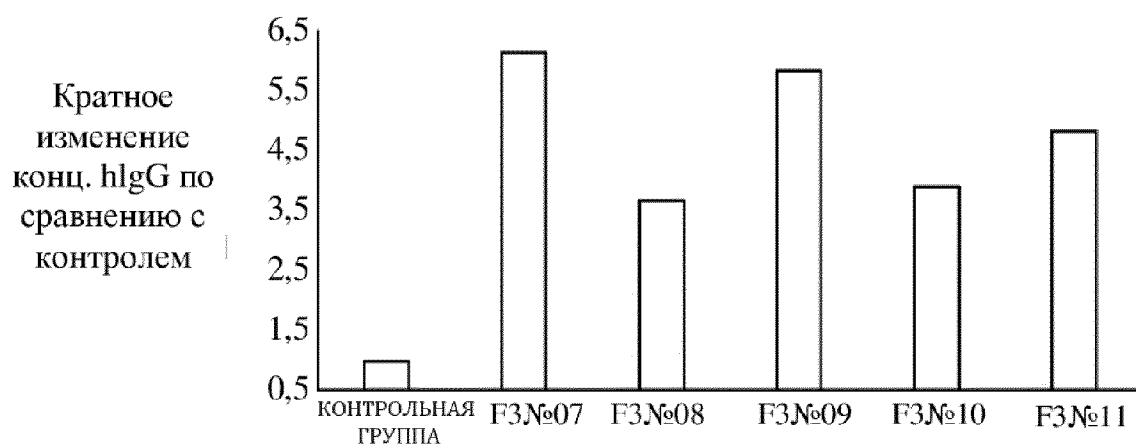
ФИГ. 40



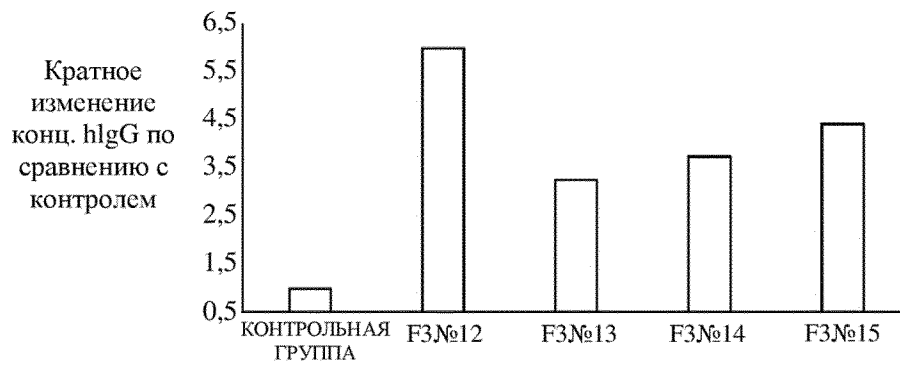
ФИГ. 41



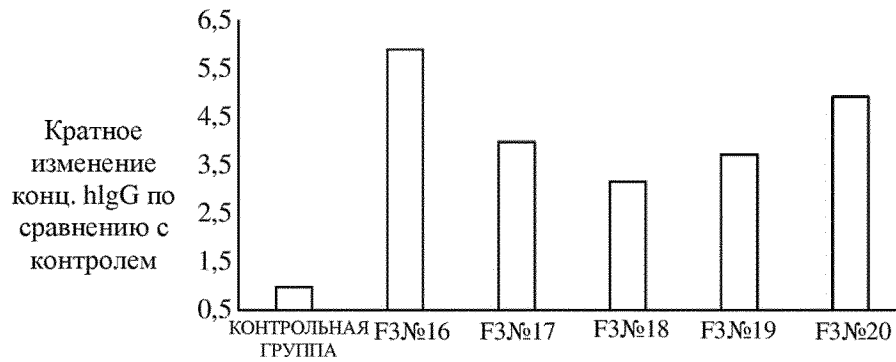
ФИГ. 42



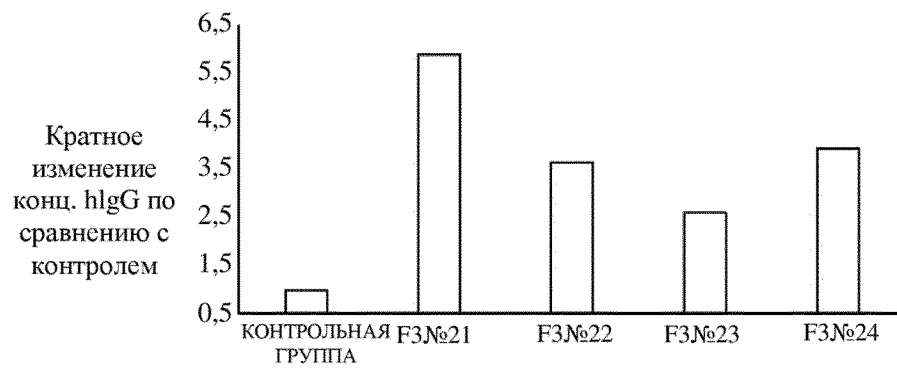
ФИГ. 43



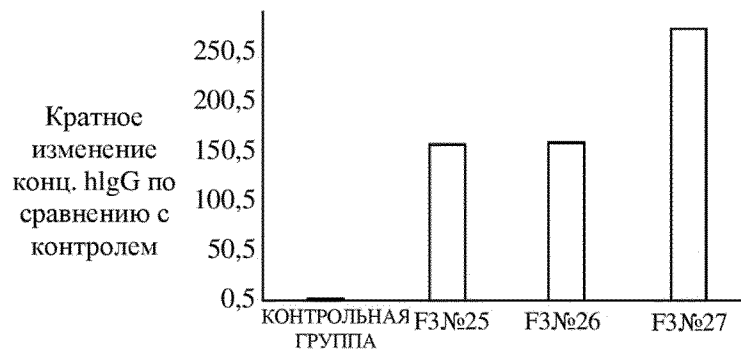
ФИГ. 44



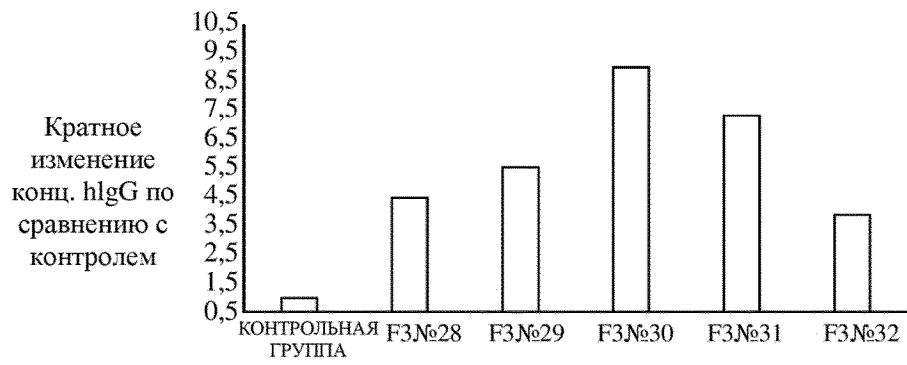
ФИГ. 45



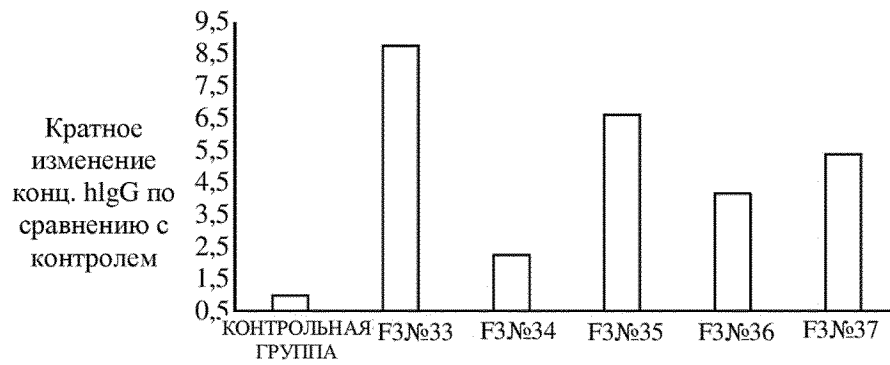
ФИГ. 46

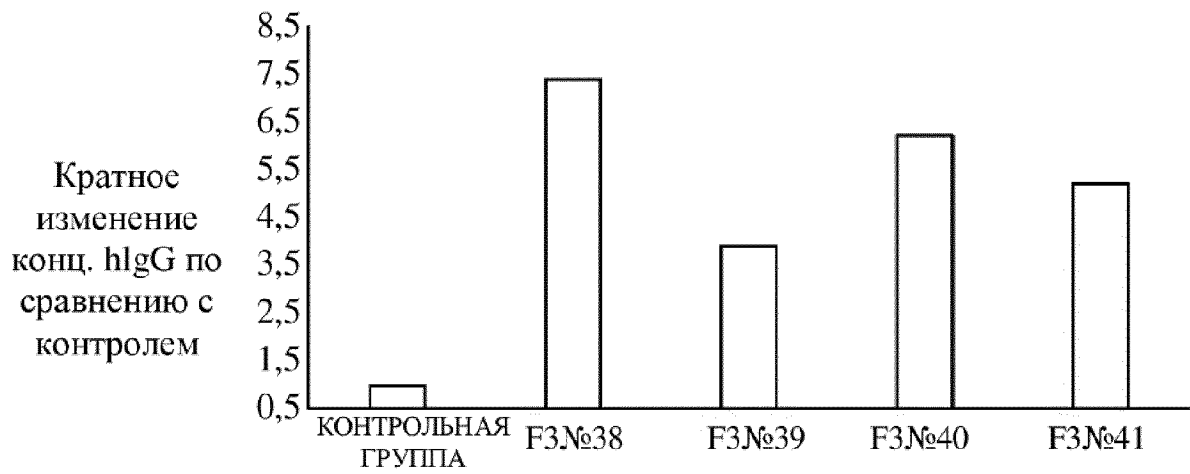
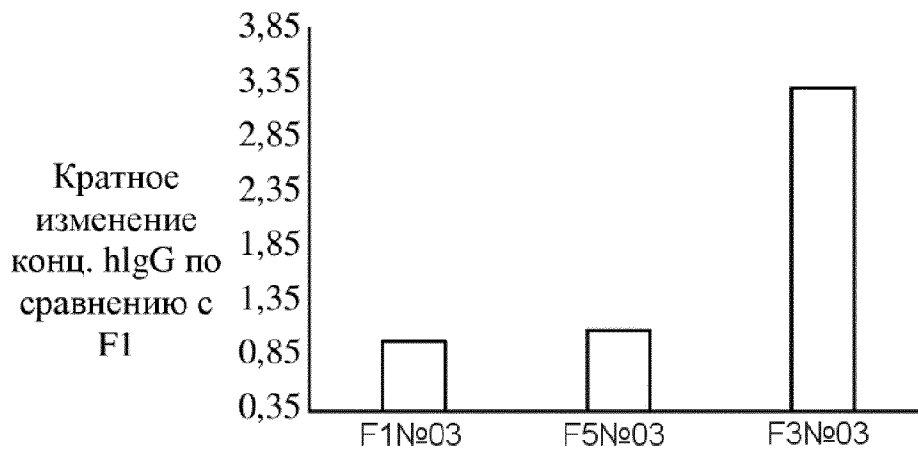


ФИГ. 47

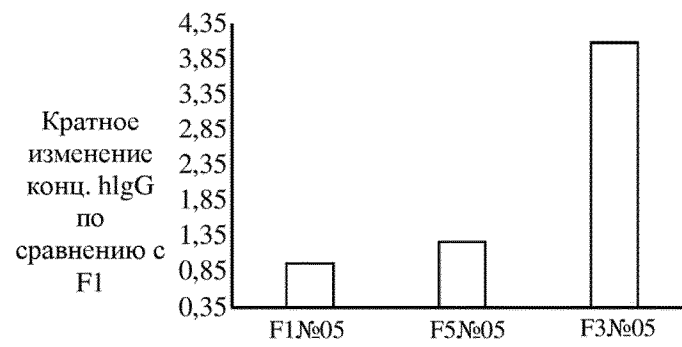


ФИГ. 48

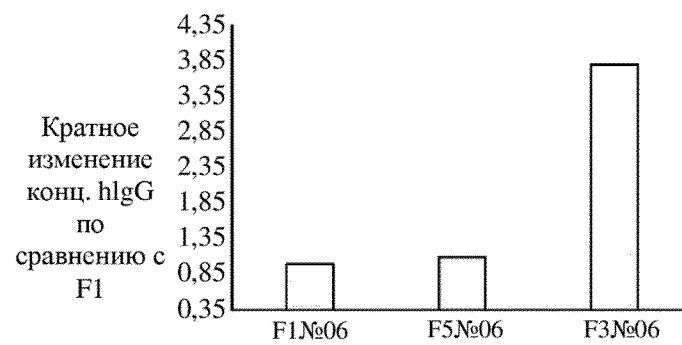


**ФИГ. 49****ФИГ. 50**

ФИГ. 51

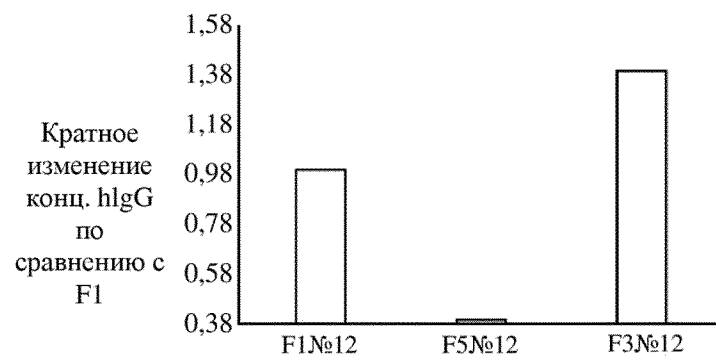


ФИГ. 52

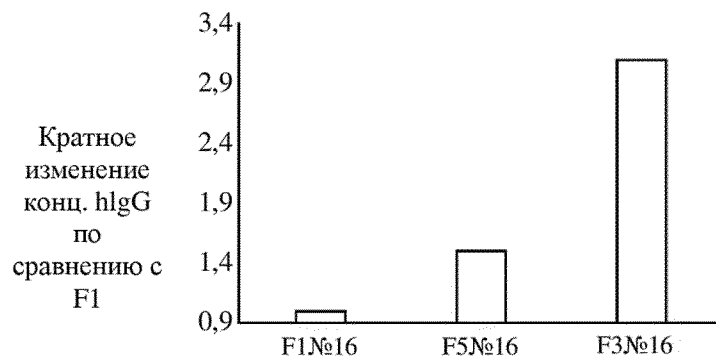


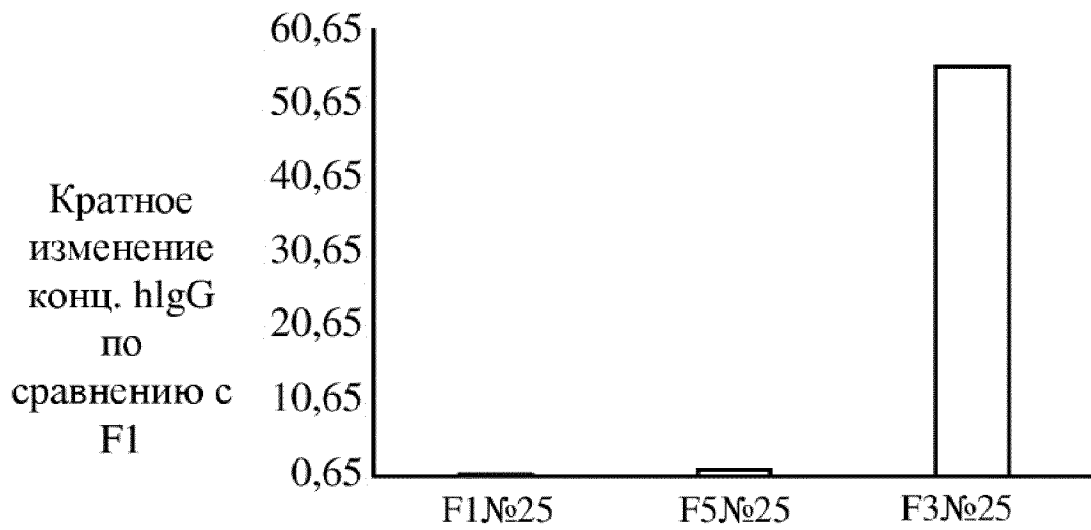
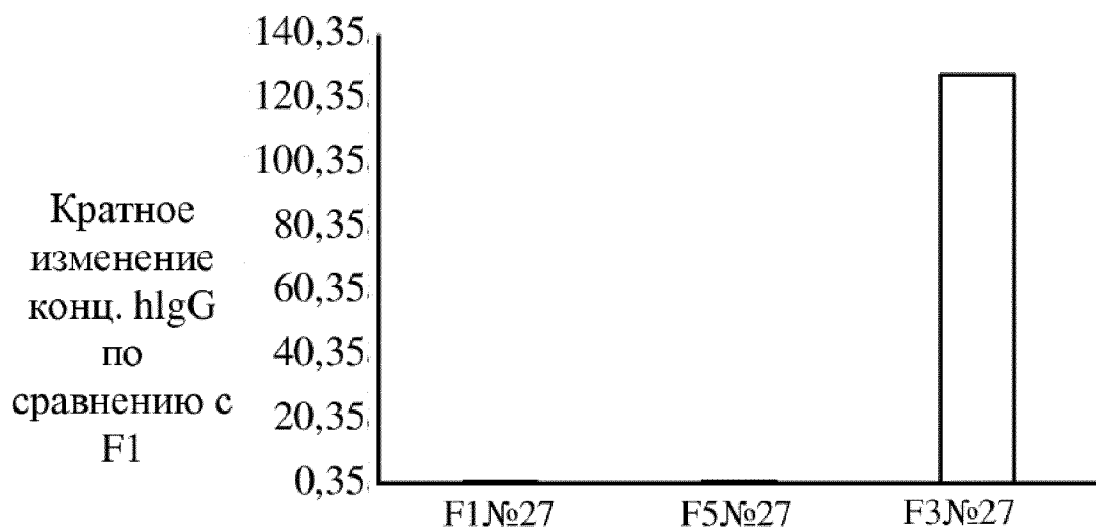


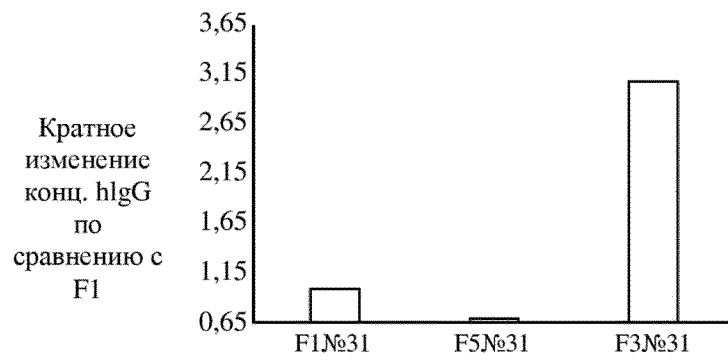
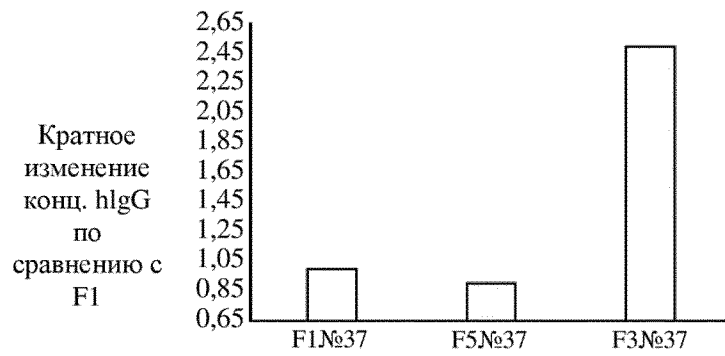
ФИГ. 53



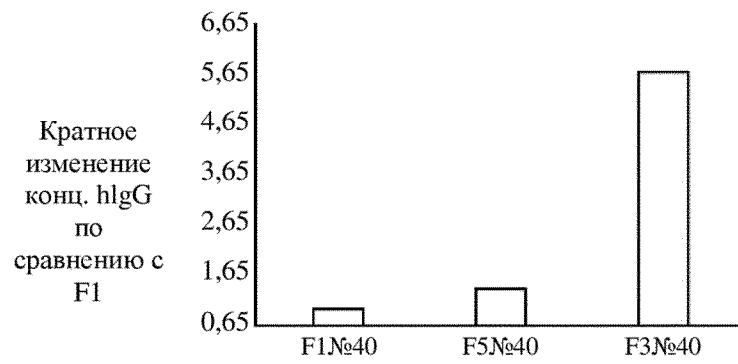
ФИГ. 54



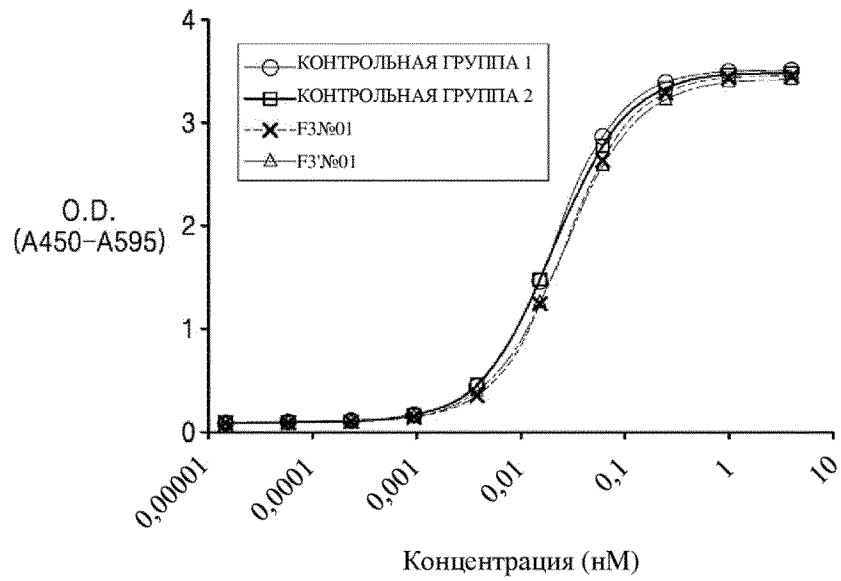
**ФИГ. 55****ФИГ. 56**

**ФИГ. 57****ФИГ. 58**

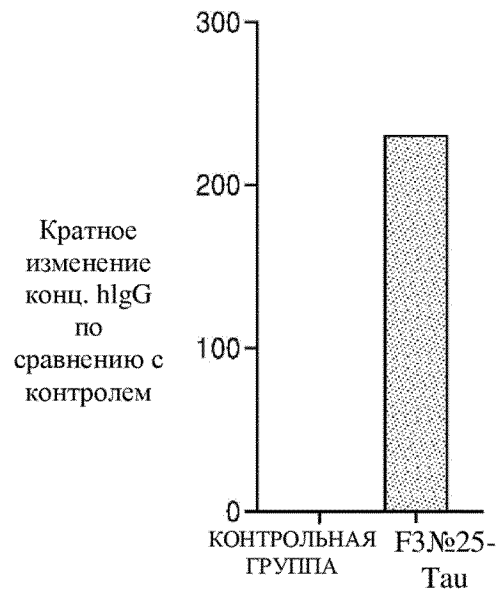
ФИГ. 59



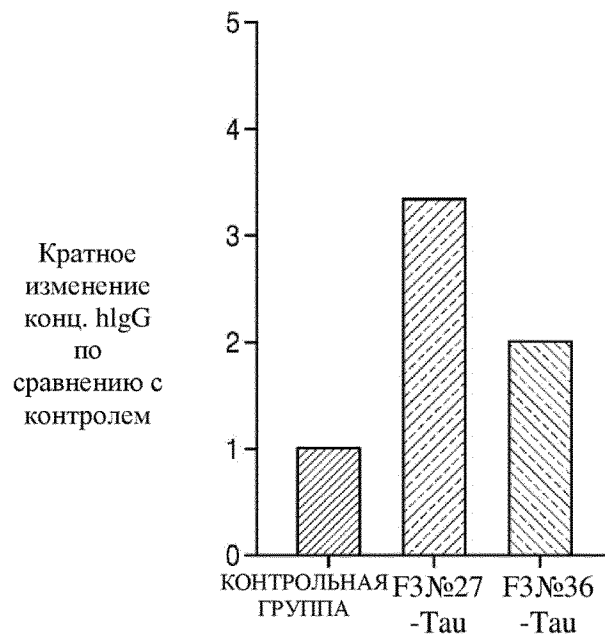
ФИГ. 60



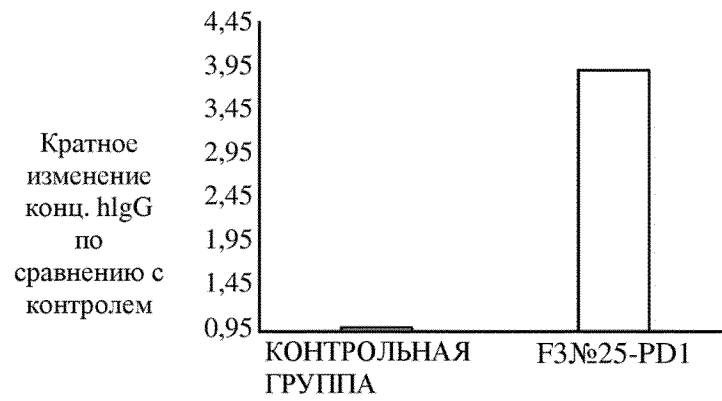
ФИГ. 61



ФИГ. 62



ФИГ. 63



ФИГ. 64



ФИГ. 65

