

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

*На правах рукописи*

Боденко Виталина Васильевна

**РАЗРАБОТКА ТАРГЕТНОГО КОНЪЮГАТА НА ОСНОВЕ КАРКАСНОГО  
БЕЛКА И ЦИТОТОКСИНА ДЛЯ ТЕРАПИИ HER2-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ  
ОПУХОЛЕЙ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, профессор

Белоусов Михаил Валерьевич

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Чернов Владимир Иванович

Томск – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
1.1 Рецептор эпидермального фактора роста HER2.....	14
1.2 Экспрессия HER2 при различных видах рака .....	16
1.3 Таргетная HER2-направленная терапия .....	18
1.4 Структура таргетных терапевтических конъюгатов .....	22
1.4.1 Молекула-носитель .....	26
1.4.2 Альтернативные каркасные белки в качестве нацеливающей молекулы	28
1.4.3 Аффибоди в качестве нацеливающей молекулы .....	33
1.4.4 Низкомолекулярные цитотоксические агенты.....	40
1.4.5 Линкер .....	46
1.4.6 Стратегии увеличения периода полувыведения терапевтических белков .....	49
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	55
2.1 Характеристика и синтез слитых белков аффибоди .....	55
2.2 Конъюгация слитых белков аффибоди с цитотоксическим агентом .....	60
2.3 Методы оценки качества таргетных терапевтических конъюгатов на основе аффибоди .....	62
2.4 Методики радиомечения таргетных терапевтических конъюгатов на основе аффибоди .....	63
2.5 Характеристика биологических объектов исследования .....	67
2.5.1 Клеточные линии и условия культивирования .....	67
2.5.2 Экспериментальные животные .....	67
2.6 Изучение функциональной пригодности таргетных терапевтических конъюгатов в исследованиях <i>in vitro</i> .....	68
2.6.1 Оценка цитотоксичности и определение IC <sub>50</sub> методом WST-8-теста .....	68
2.6.2 Оценка специфичности связывания .....	71
2.6.3 Измерение аффинности связывания.....	72
2.6.4 Оценка интернализации.....	74
2.7 Изучение функциональной пригодности, биораспределения и фармакокинетики таргетных терапевтических конъюгатов <i>in vivo</i> .....	76

2.7.1 Изучение группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров на здоровых мышцах линии NMRI.....	76
2.7.2 Изучение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, на здоровых мышцах линии CD-1 .	77
2.7.3 Изучение на моделях опухолевого роста группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения ...	78
2.7.4 Изучение на моделях опухолевого роста группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами .....	79
2.8 Проведение экспериментальной терапии <i>in vivo</i> для оценки противоопухолевого эффекта группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами .....	80
2.9 Статистический анализ .....	82
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	83
3.1 Получение и оценка качества таргетных терапевтических конъюгатов .....	83
3.2 Результаты получения радиокомплексов таргетных терапевтических конъюгатов .....	89
3.3 Изучение функциональной пригодности таргетных терапевтических конъюгатов в исследованиях <i>in vitro</i> .....	92
3.3.1 Результаты оценки цитотоксичности и определение $IC_{50}$ .....	92
3.3.2 Результаты оценки специфичности связывания .....	98
3.3.3 Результаты оценки аффинности связывания.....	100
3.3.4 Результаты оценки интернализации.....	103
3.4 Результаты оценки функциональной пригодности, биораспределения и фармакокинетики таргетных терапевтических конъюгатов <i>in vivo</i> .....	109
3.4.1 Изучение <i>in vivo</i> группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров в исследованиях на здоровых мышцах линии NMRI	109
3.4.2 Изучение <i>in vivo</i> группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающих период полувыведения .....	115
3.4.3 Изучение <i>in vivo</i> группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами.....	125
3.5 Проведение экспериментальной терапии <i>in vivo</i> для оценки противоопухолевого эффекта группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами .....	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	138

ВЫВОДЫ .....	140
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, ТЕРМИНОВ.....	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	144
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	170
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	173
ПРИЛОЖЕНИЕ В .....	179

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Ежегодно в мире регистрируется около 20 миллионов новых случаев онкологических заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на 2022 год в России зарегистрировано 635560 случаев обнаружения злокачественных новообразований и 311729 смертельных исходов [210]. Несмотря на прогресс в диагностике и терапии, многие виды рака остаются устойчивыми к существующим методам лечения, что подчеркивает необходимость разработки новых эффективных и безопасных препаратов. Углубленное понимание патогенеза и механизмов развития рака, в частности открытие молекулярных мишеней, ассоциированных с опухолью, способствовало становлению и бурному развитию таргетной медицины. Точное нацеливание терапевтического средства на опухоль позволяет эффективно доставить цитотоксический агент в опухолевую клетку и минимизировать токсическое воздействие на здоровые ткани. Ввиду повышенной экспрессии и высокого онкогенного потенциала при ряде злокачественных новообразований эпителиального происхождения, важной молекулярной мишенью является рецептор эпидермального фактора роста человека, тип 2 (HER2) [53, 177]. HER2 представляет собой трансмембранный белок с тирозинкиназной активностью, играющий решающую роль в пролиферации, выживании и дифференцировке здоровых клеток [53]. Амплификация и (или) гиперэкспрессия HER2 обнаруживается в 20–30 % случаев рака молочной железы [28], 6–30 % случаев рака желудка и гастроэзофагеальных аденокарцином [101], 2–66 % случаев рака яичников [190], 60 % случаев рака эндометрия [97], 6–17 % случаев рака мочевого пузыря [109], 2–6 % случаев рака легких [20], 3–5% случаев рака толстой кишки [179]. Гиперэкспрессия или амплификация HER2 коррелирует с агрессивным поведением опухоли и плохим прогнозом [127]. Мутации, приводящие к активации HER2, способствуют ускоренному опухолеобразованию и метастазированию [19]. Несмотря на впечатляющие клинические результаты, одобренные к применению

HER2-нацеленные таргетные терапевтические лекарственные препараты на основе моноклональных антител (трастузумаб, пертузумаб) и конъюгатов антител с цитотоксическими агентами (трастузумаб эмтанзин, трастузумаб дерукстекан) обладают токсичностью и проблемой резистентности как первичной, так и приобретенной в ходе лечения [136]. Высокая распространенность HER2-положительных опухолей в сочетании с их агрессивным фенотипом и ограничениями существующей таргетной терапии обуславливают актуальность разработки новых HER2-направленных таргетных терапевтических агентов. Несмотря на высокую аффинность связывания с мишенью, специфичность и терапевтический вклад антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), обеспечивающие успешное клиническое применение, у моноклональных антител (мкАТ), используемых в качестве носителя цитотоксической нагрузки, существует ряд недостатков – нелинейное распределение и выведение, иммуногенность, побочные токсические явления, низкая химическая и термическая стабильность, высокая стоимость и сложность производства, связанная с рядом требований к клеточным системам экспрессии [89]. В качестве носителя цитотоксической нагрузки в таргетных терапевтических конъюгатах перспективной альтернативой моноклональным антителам являются высокоаффинные каркасные белки аффибоди (*Affibody Medical AB*) [82, 194].

Молекула аффибоди ( $Z_{HER2:2891}$ ) состоит из трехспирального каркаса, модифицированного В-домена белка А (58 аминокислот, 6,5 кДа). Каркасный белок аффибоди обладает рядом преимуществ: малым размером, обеспечивающим быструю экстравазацию и диффузию во внеклеточное пространство, высокой аффинностью к HER2 (65 пМ), рекомбинантным производством у прокариот, перспективами последующих белково-инженерных манипуляций с возможностью получения гибридов с другими функциональными модулями, а также низкими затратами на производство [82]. Молекулы аффибоди, меченные радиоактивным изотопом для молекулярной визуализации, находятся в клинической разработке и

продемонстрировали впечатляющую способность нацеливания и контрастность визуализации HER2-экспрессирующих опухолей и метастазов [24].

При разработке таргетных конъюгатов лекарственного средства большое значение имеет оптимизация молекулярного дизайна нацеливающего белка, в частности выбор линкера и цитотоксического лекарственного средства. Двумя широко используемыми классами цитотоксических веществ являются майтансиноиды и ауристатины, дестабилизирующие полимеризацию тубулина. Производное майтанзина – эмтанзин (DM1) на данный момент применяется в составе конъюгата с мКАТ для HER2-направленной терапии (трастузумаб эмтанзин) [44, 140, 198–201]. Аналогично, имеется опыт клинического применения производных ауристатина, таких как монометил ауристатин E (ММАЕ), в составе терапевтических конъюгатов (брентуксимаб ведотин полатузумаб ведотин, энфортумаб ведотин, тисотумаб ведотин, диситамаб ведотин), одобренных к применению FDA (Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) [36].

Исследования показали, что для достижения оптимальных фармакокинетических свойств препарата на основе аффибоди, главным образом, для снижения почечной экскреции, необходимо контролируемое увеличение времени его нахождения в плазме крови [82]. Для реализации этой цели в составе конъюгатов на основе аффибоди в доклинических исследованиях успешно применялся альбумин-связывающий домен ABD<sub>035</sub> [31, 70]. Перспективными подходами также является применение неструктурированных биоразлагаемых полипептидов PAS и XTEN [129]. Альбумин-связывающий домен ABD<sub>035</sub> нековалентно связывается с сывороточным альбумином крови, полипептиды PAS и XTEN состоят из случайной последовательности аминокислот (пролин, аланин и серин для PAS, аланин, пролин, серин, треонин, глицин и глутаминовая кислота для XTEN) и увеличивают гидродинамический радиус слитых белков [46].

Таким образом, конъюгаты, состоящие из высокоаффинного каркасного белка аффибоди и цитотоксического агента, являются перспективными

таргетными препаратами для HER2-направленной терапии. Необходимы исследования влияния цитотоксических агентов, полипептидов для увеличения периода полувыведения, а также состава аминокислотных линкеров на аффинность, цитотоксичность, таргетные и фармакокинетические свойства конъюгата для разработки наиболее эффективного терапевтического средства.

**Степень разработанности проблемы.** Молекулы аффибоди успешно продемонстрировали свою эффективность в качестве нацеливающих молекул в доклинических и в клинических исследованиях I и II фазы, преимущественно как носители радионуклидов для диагностического применения: [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-ABY-025 (тезатабеп матракетан) [48, 110, 111, 126, 135], [ $^{18}\text{F}$ ]F-GE-226 [187] – для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), [ $^{111}\text{In}$ ]In-ABY-002 [139], [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2}:41071}$  – для визуализации HER2-положительного метастатического РМЖ с использованием однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) [152], а также  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-MAL-MZHER2 для ПЭТ визуализации HER2-положительных карциномы желудка или гастроэзофагеальной карциномы [24, 117]. Эффективность молекул аффибоди в качестве носителей низкомолекулярных цитотоксических агентов в составе конъюгатов для терапевтических применений была продемонстрирована в доклинических исследованиях. Конъюгат молекулы аффибоди  $Z_{\text{HER2}:2891}$ , слитой с альбумин-связывающим доменом ( $\text{ABD}_{035}$ ), и цитотоксина DM1 продемонстрировал специфическое цитотоксическое воздействие *in vitro* и эффективную регрессию HER2-экспрессирующих опухолей *in vivo* [64].

**Цель работы.** Исследование и разработка нового HER2-направленного терапевтического конъюгата на основе высокоаффинного каркасного белка аффибоди и цитотоксического агента.

**Задачи исследования:**

1. Нарботать линейку и оценить качество HER2-направленных терапевтических конъюгатов на основе высокоаффинного каркасного белка аффибоди и цитотоксического агента.

2. Исследовать функциональную пригодность HER2-направленных терапевтических конъюгатов *in vitro*: цитотоксические свойства, специфичность связывания, аффинность и интернализацию.

3. Исследовать фармакокинетические свойства HER2-направленных терапевтических конъюгатов *in vivo*.

4. Изучить HER2-таргетные свойства и биораспределение терапевтических конъюгатов *in vivo* на моделях опухолевого роста.

5. Провести экспериментальную терапию *in vivo* для оценки противоопухолевого эффекта HER-2 направленных конъюгатов.

**Научная новизна.** На сегодняшний день в клинической практике отсутствуют препараты таргетных терапевтических конъюгатов на основе аффибоди. Впервые разработаны HER2-направленные терапевтические конъюгаты на основе каркасного белка аффибоди Z<sub>HER2:2891</sub>, слитого с ABD, PAS или XTEN, и цитотоксических агентов DM1, MMAE или MMAF с включением междоменных глицин-сериновых линкеров G<sub>4</sub>S, (G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>, (S<sub>3</sub>G)<sub>3</sub>.

Для разработанных конъюгатов впервые определены *in vitro* цитотоксические свойства, высокая специфичность и аффинность к рецептору HER2 и медленная интернализация.

Для разработанных конъюгатов впервые изучены фармакокинетические свойства *in vivo*. Показано, что линкеры с повторами серина (G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub> и (S<sub>3</sub>G)<sub>3</sub> значительно снижают накопление разработанных конъюгатов в печени, по сравнению с коротким линкером G<sub>4</sub>S. Впервые для аффибоди применены стратегии увеличения периода полувыведения с использованием неструктурированных полипептидов XTEN и PAS.

Впервые установлены для исследуемых конъюгатов таргетные свойства *in vivo* в HER2-экспрессирующих ксенографтах опухоли аденокарциномы яичников SKOV3 в сравнении с HER2-негативными ксенотрансплантатами опухоли Ramos.

Впервые определен терапевтический эффект *in vivo* с введением конъюгатов Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF и Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1 в дозе 2,9 мг/кг в отношении HER2-экспрессирующих ксенографтов аденокарциномы яичников SKOV3.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В результате проведенных исследований наработана линейка новых терапевтических HER2-направленных конъюгатов на основе высокоаффинного каркасного белка аффибоди и оценено влияние структурных доменов полученных конъюгатов на их свойства. Доклинические исследования *in vitro* и *in vivo* выявили высокую перспективность полученных конъюгатов для разработки нового HER2-направленного терапевтического лекарственного средства. Установлено высокоспецифичное опухолевое поглощение *in vivo* в HER2-экспрессирующих моделях опухолевого роста. Выявлена эффективная терапевтическая доза полученных конъюгатов при курсовом введении животным с HER2-экспрессирующими ксенографтами опухоли. Полученные данные могут быть использованы для создания новых эффективных таргетных конъюгатов на основе каркасных белков и цитотоксических агентов, предназначенных для терапии опухолей с гиперэкспрессией HER2, а также для модификации структуры существующих таргетных конъюгатов с целью улучшения их фармакокинетических и таргетных свойств и повышения эффективности терапии.

**Методология и методы исследования.** Экспериментальный раздел работы выполнен на базе лаборатории иммунологии, генетики и патологии Уппсальского университета (Швеция), в научно-исследовательском центре «Онкотераностика» исследовательской школы химических и биомедицинских технологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет». В соответствии с поставленными задачами были выбраны современные комплексные клеточные, молекулярно-биологические и радиометрические методы. В качестве модельной системы *in vitro* были использованы HER2-позитивные клеточные линии аденокарциномы яичников

SKOV3, аденокарциномы молочной железы SKBR3, AU565, протоковой карциномы молочной железы BT474, и клеточные линии с низкой экспрессией HER2 – аденокарциномы легкого A549 и аденокарциномы молочной железы MCF7. Были использованы следующие методы исследования: определение специфичности связывания, аффинности связывания и интернализации *in vitro* на клеточных культурах опухолей человека; определение биораспределения *in vivo* на здоровых мышах стока CD1 и линии NMRI; определение таргетной специфичности *in vivo* на иммунодефицитных мышах линии BALB/c nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты опухоли; проведение экспериментальной терапии *in vivo* на иммунодефицитных мышах линии BALB/c nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты опухоли. Объектами исследования являлись конъюгаты аффибоди  $Z_{HER2:2891}$ , слитого с ABD, PAS или XTEN, и цитотоксических агентов DM1, MMAE или MMAF с включением междоменных линкеров  $G_4S$ ,  $(G_3S)_3$ ,  $(S_3G)_3$ .

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Разработаны HER2-направленные терапевтические конъюгаты на основе аффибоди  $Z_{HER2:2891}$ , слитого с ABD, PAS или XTEN, и цитотоксических агентов DM1, MMAE или MMAF с включением междоменных линкеров  $G_4S$ ,  $(G_3S)_3$ ,  $(S_3G)_3$  с высокой чистотой.

2. Разработанные таргетные терапевтические конъюгаты специфично связываются с рецептором HER2 с высокой аффинностью, медленно интернализуются, проявляют целенаправленные высокоактивные цитотоксические свойства в наномолярном диапазоне концентраций. Конъюгат с  $G_4S$  линкером, ABD и MMAF проявляет наиболее высокую целенаправленную цитотоксичность.

3. Состав, длина и заряд междоменных линкеров влияют на биораспределение исследуемых терапевтических конъюгатов у мышей. Более длинные гидрофильные линкеры из 12 аминокислот с высоким содержанием серина обеспечивают снижение поглощения конъюгатов печенью у мышей.

4. Разработанные таргетные терапевтические конъюгаты специфично накапливаются в HER2-позитивных ксенографтах опухоли *in vivo*. Неструктурированные полипептидные полимеры XTEN576, PAS600, по сравнению с полимерами XTEN288, PAS300, более эффективно увеличивают время удержания в крови разработанных таргетных терапевтических конъюгатов, сохраняя специфичность опухолевого поглощения *in vivo*.

5.  $Z_{HER2}$ -G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF значительно ингибирует рост опухоли у мышей с HER2-позитивными ксенографтами аденокарциномы рака яичников SKOV3 с недостигнутой медианой выживаемости в течение 90 дней исследования и полной ремиссией без видимых опухолей у 50 % мышей в дозе 2,9 мг/кг. В исследуемой дозе  $Z_{HER2}$ -G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF имеет большую эффективность, по сравнению с конъюгатом  $Z_{HER2}$ -G<sub>4</sub>S-ABD-DM1, медиана выживаемости которого составила 57 дней.

**Степень достоверности и апробация работы.** Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методических подходов. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены экспериментальными материалами, результатами статистической обработки полученных результатов. Основные положения диссертационной работы были доложены на 9 конференциях, в том числе, на международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2021 г., 2022 г, 2023 г), XI международной научно-практической конференции «Физико-технические проблемы в науке, промышленности и медицине» (Томск, 2022 г.), всероссийском конгрессе «Ядерная медицина 2022» ( Санкт-Петербург, 2022 г.), XXVI международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2023), II международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2023 г.), XX международной конференции студентов, аспирантов и

молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2023 г.), VIII Международной научно-практической конференции «Медицинские и экологические эффекты ионизирующего излучения» (Томск, 2025 г.).

**Личный вклад автора.** Автором лично выполнен поиск и анализ научной литературы по теме исследования. Автор участвовал в проведении экспериментальной части исследования на всех этапах, выполнял статистическую обработку полученных данных и их анализ, формулировал научные положения, итоговые заключения и выводы по итогам диссертационной работы. При активном участии автора подготовлены научные публикации, отражающие основные результаты исследования.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях и журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, и входящих в международные базы данных и системы цитирования Scopus, Web of Science; 7 тезисов в материалах научных конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 183 страницах, содержит 18 таблиц и 54 рисунка. Библиография включает 210 источников.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Рецептор эпидермального фактора роста HER2

*Биология рецептора эпидермального фактора роста HER2.* Рецептор эпидермального фактора роста человека 2 типа, HER2 (англ. human epidermal growth factor receptor, type 2) является представителем семейства трансмембранных рецепторных тирозинкиназ известных как ErbB (англ. erythroblastic leukemia viral oncogene homolog B) или HER: EGFR (HER1, ErbB-1), HER2 (HER2/c-neu, ErbB-2), HER 3 (ErbB-3). Рецептор HER2 представляет собой трансмембранный гликопротеин 1 типа, состоящий из трех доменов: большого N-концевого внеклеточного домена (620 аминокислотных остатков), трансмембранного домена с одной  $\alpha$ -спиралью (23 аминокислотных остатка) и C-концевого внутриклеточного тирозинкиназного домена (500 аминокислотных остатков) [177]. Внеклеточный домен состоит из tandemного повтора двух типов субдоменов – I и III, II и IV. Богатые лейцином субдомены I и III образуют сайт связывания для потенциальных лигандов рецептора. В то время как богатые цистеином субдомены II и IV участвуют во внутримолекулярном взаимодействии, аутоингибировании и процессах гомо- и гетеродимеризации [165]. Рецепторы эпидермального фактора роста существуют в неактивном мономерном состоянии в виде компактной «связанной» конформации, обусловленной внутримолекулярной связью между субдоменами II и IV (аутоингибированное состояние), и переходят в активное состояние после связывания с лигандом и последующей димеризации. Связывание с нативным лигандом вызывает ассоциацию между субдоменом I и III, которые образуют лиганд-связывающий карман и открывают субдомен II, обеспечивая димеризацию между идентичными рецепторами – гомодимеризацию (HER2/HER2) или с другими членами семейства – гетеродимеризацию (HER1/HER2 или HER2/HER3). Для осуществления этих процессов субдомен II содержит

димеризационное плечо, короткую шпильковую петлю, выступающую за пределы субдомена II для контакта с димеризационным плечом партнера по димеризации [177]. Рецептор HER2, в отличие от других членов семейства ErbB, не имеет известных лигандов, существует в устойчивой открытой конформации, позволяющей димеризоваться без связывания с лигандом и является предпочтительным партнером по димеризации для других членов семейства [165, 184].

В результате димеризации HER2 и активации внутренней протеинкиназной активности киназные домены катализируют фосфорилирование тирозиновых остатков, что запускает каскад биохимических реакций посредством сигнальных путей, главным образом RAS-RAF-MAPK, PI3k/AKT, а также фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы C (PLC $\gamma$ ). Активация сигнальных путей приводит к транскрипции генов, участвующих в пролиферации, дифференцировке и миграции клеток [53].

*Онкогенная роль HER2.* Лиганд-независимая активность HER2 способствует его ключевой роли в развитии и поддержании онкогенного процесса при раке. HER2 может образовывать гетеродимеры с EGFR (HER1), при этом гетеродимеры HER2/HER1 усиливают онкогенные сигнальные пути эффективнее в сравнении с гомодимерами HER1 или HER2 по отдельности. Рецептор HER3 обладает нарушенной киназной активностью, но имеет уникальную связь с HER2. Гетеродимеры HER2/HER3 наиболее эффективны в активации нисходящих сигнальных путей ввиду сильного фосфорилирования HER3 после димеризации с HER2 [57]. Гетеродимер HER2/HER3 особенно важен при раке простаты [85] и груди [103], где он усиливает онкогенную сигнализацию и способствует агрессивному поведению опухолей. Значение гетеродимеров HER2/HER4 в биологии рака менее ясно [57].

При гиперэкспрессии HER2 образуются множественные димеры HER2, и клеточная сигнализация становится интенсивнее, что приводит к повышенной чувствительности к факторам роста и опухолевой трансформации [5]. HER2

обладает наиболее мощной каталитической киназной активностью, а гетеродимеры, содержащие HER2, обладают наиболее сильными сигнальными функциями [12]. Кроме того, димеризация HER2 способствует быстрой деградации ингибитора клеточного цикла, белка p27kip1, что приводит к прогрессированию клеточного цикла [143].

## 1.2 Экспрессия HER2 при различных видах рака

Амплификация и (или) гиперэкспрессия HER2 обнаруживается в 20–30 % случаев рака молочной железы [28], 6–30 % случаев рака желудка и гастроэзофагеальных аденокарцином [101], 2–66 % случаев рака яичников [190], 60 % случаев рака эндометрия [97], 6–17 % случаев рака мочевого пузыря [109], 2–6 % случаев рака легких [20], 3–5% случаев рака толстой кишки [179].

*Рак молочной железы.* РМЖ является наиболее распространенным видом рака среди женщин. Примерно у 20–30 % людей с карциномой молочной железы наблюдается повышенный уровень экспрессии HER2, что способствует агрессивности рака и затрудняет его лечение эндокринной терапией [28]. В клетках карциномы молочной железы повышенная экспрессия гена HER2 стимулирует размножение и миграцию опухолевых клеток, активируя различные пути передачи сигнала, такие как PI3K/АКТ, Ras/Raf/MEK/МАРК, а также связан с неблагоприятными результатами выживаемости. Однако HER2-направленная терапия значительно увеличила показатели выживаемости у пациентов с HER2-положительным РМЖ [20].

*Рак яичников.* Рак яичников занимает второе место по частоте причин смертности при гинекологических онкологических заболеваниях. Выявление рака яичников на ранней стадии представляет собой значительную проблему. Отсутствие типичных симптомов на ранних стадиях и агрессивная природа данного вида рака приводят к его быстрому прогрессированию от ранней до

распространенной стадии в течение года. В результате более 70 % пациентов оказываются диагностированы на поздних стадиях. Гиперэкспрессия/амплификация HER2 в опухолях яичников варьируется от 2 до 66 % и связана с плохим прогнозом заболевания, быстрым ростом опухолевых клеток, образованием колоний и репарацией ДНК [190]. Гиперэкспрессия HER2 при эпителиальном раке яичников часто наблюдается в серозном подтипе, реже обнаруживается при муцинозной карциноме, но ее интенсивность высока [96].

*Рак желудка и гастроэзофагеальная аденокарцинома.* Данные клинического исследования ToGA демонстрируют, что гиперэкспрессия и/или амплификация HER2 наблюдается в 21,4 % случаев рака желудка и в 32,2 % случаев гастроэзофагеальных аденокарцином [202]. Согласно данным более поздних исследований, гиперэкспрессия HER2 выявляется в 6-30 % случаев рака желудка и гастроэзофагеальных аденокарцином [98]. Экспрессия HER2 при HER2-положительном раке желудка, как правило, более гетерогенна, чем при раке молочной железы. Согласно ряду исследований, повышенная экспрессия HER2 служит неблагоприятным прогностическим фактором у пациентов с раком желудка и коррелирует с низкой выживаемостью пациентов [100].

*Рак предстательной железы.* S Signoretti et al. проанализировали экспрессию HER2 в образцах опухолей аденокарциномы предстательной железы при различных клинических состояниях с помощью оценки ДНК, РНК и белка с использованием иммуногистохимии HER2 и анализа FISH. Результаты показали гиперэкспрессию белка HER2 в 25 % нелеченых первичных опухолей, 59 % локализованных опухолей в постнеoadьювантной гормональной терапии и 78 % кастрационно-метастатических опухолей [104].

*Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).* При НМРЛ HER2 гиперэкспрессируется у 35 % пациентов, а высокий уровень экспрессии HER2 (ИНС 3+) наблюдается только в 2–6 % случаев. Однако, амплификация гена (10–20 %) и мутация (2–4 %) HER2 более значимы при НМРЛ, чем гиперэкспрессия [20]. Два метаанализа показывают, что гиперэкспрессия HER2 у пациентов с раком легких

связана с более низкой выживаемостью, а недавние исследования показали, что гиперэкспрессия HER2 приводит к плохому прогрессированию аденокарциномы легких и ранней стадии НМРЛ [43, 191].

### 1.3 Таргетная HER2-направленная терапия

#### Моноклональные антитела

*Трастузумаб (герцептин)* является первым рекомбинантным гуманизированным мкАТ, одобренным FDA для лечения пациентов с метастатическим HER2-положительным РМЖ. Трастузумаб селективно связывается с субдоменом IV внеклеточного домена HER2, и блокирует димеризацию и нисходящую опухолевую сигнализацию. Трастузумаб также связывается с Fc-рецепторами на иммунных эффекторных клетках, вызывая ADCC непосредственно против HER2-положительных опухолей [58]. Трастузумаб разрешен к применению и одобрен FDA в 1998 году в качестве терапии первой линии в комбинации с таксанами для пациентов с метастатическим РМЖ. Эффективность адьювантного применения была оценена в четырех основных исследованиях III фазы HERA, NSABP B31, NCCTG9831, BCIRG 006. Кардиотоксичность при применении трастузумаба является превалирующим нежелательным явлением при метастатическом раке молочной железы (МРМЖ) и раке молочной железы на ранних стадиях [176, 204]. Согласно клиническому исследованию III фазы ToGA, в 2010 г. трастузумаб в сочетании с химиотерапией также был одобрен в качестве стандартного лечения первой линии для пациентов с поздней стадией HER2-положительного рака желудка (РЖ) и кардиоэзофагеального перехода (КЭП) [202].

*Пертузумаб* — гуманизированное рекомбинантное мкАТ, ингибирующее образование димеров между HER2 и другими членами семейства HER путем связывания с субдоменом II внеклеточного домена рецептора HER2. Пертузумаб

не влияет на связывание трастузумаба с эпитопом HER2, следовательно, совместное применение пертузумаба, трастузумаба может эффективнее блокировать сигнализацию HER2. Исследования, в которых комбинация трастузумаба и пертузумаба сочетались с химиотерапией в качестве лечения HER2-положительного РМЖ в метастатических (CLEOPATRA), в неоадьювантных (NeoSphere, TRYPHAENA) и адьювантных (APHINITY) условиях, продемонстрировали лучшие результаты и выживаемость пациентов по сравнению с комбинацией трастузумаба и химиотерапии, что привело к одобрению пертузумаба в этих условиях [9].

### **Низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ**

*Лапатиниб (тайверб, тайкерб)* селективно ингибирует активность тирозинкиназ EGFR (HER1) и HER2 путем обратимого и конкурентного ингибирования АТФ-связывающих участков их внутриклеточных доменов, снижением фосфорилирования путей RAS/RAF/MEK/ERK и PI3K/Akt и пролиферации опухолевых клеток. Воздействуя на внутриклеточный киназный домен, лапатиниб преодолевает резистентность к трастузумабу, опосредованную рядом механизмов: экспрессией усеченного варианта p95HER2, активацией параллельного сигнального каскада посредством рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R), активацией клеточных сигнальных каскадов вследствие дефицита белка PTEN [176]. Для клинического применения одобрена комбинация лапатиниба и капецитабина для терапии пациентов с HER2-положительным распространенным РМЖ с прогрессированием после терапии на основе антрациклинов, таксанов и трастузумаба.

### **Конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC)**

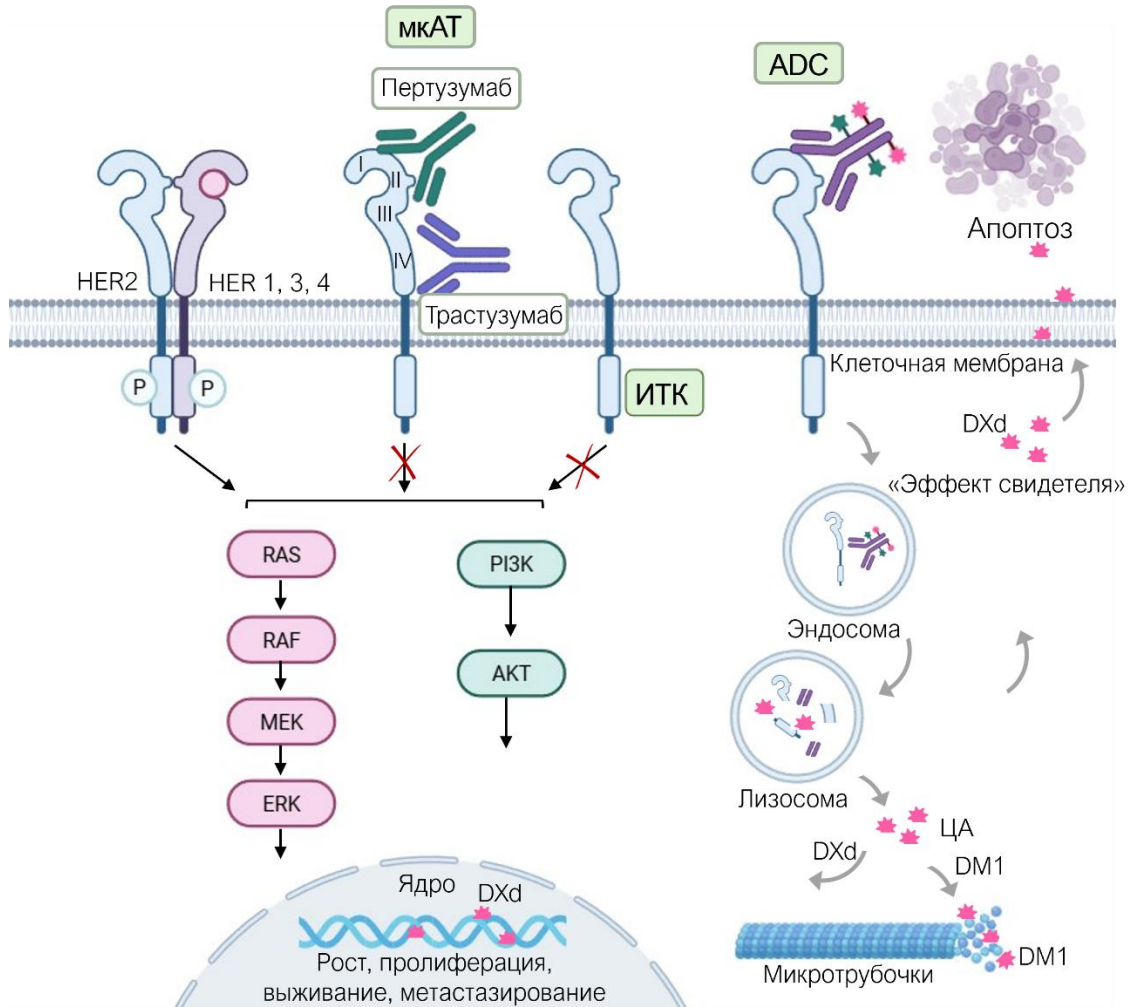
*Трастузумаб эмтанзин (T-DM1, Kadcyla®)*, первый конъюгат «антитело-лекарственное средство» (англ. antibody-drug conjugate, ADC), одобренный FDA в 2013 году для терапии HER2-положительного рака молочной железы на поздней стадии. Трастузумаб эмтанзин представляет собой молекулу трастузумаба, конъюгированную через нерасщепляемый малеимидный линкер

малеимидометилциклогексан-1-карбоксилата (mcc) с цитотоксином эмтанзином (DM1) со средним соотношением препарата к антителу (DAR) 3,5. На основании данных двух крупных клинических исследований EMILIA и TH3RESA трастузумаб эмтанзин показан к применению при метастатическом HER2-положительным РМЖ в качестве терапии второй линии [200]. Данные клинического исследования III фазы KATHERINE указали на возможность расширения спектра применения трастузумаба эмтанзина. Среди пациентов с HER2-положительным РМЖ, у которых после завершения неoadъювантной терапии сохранялась опухоль, риск прогрессирования заболевания или смерти при применении трастузумаба эмтанзина в адъювантном режиме был на 50 % ниже, чем при монотерапии трастузумабом [199]. Однако при рассмотрении трастузумаба эмтанзина в качестве основной неoadъювантной терапии, рандомизированное многоцентровое открытое исследование III фазы KRISTINE выявило, что трастузумаб эмтанзин в сочетании с пертузумабом уступает традиционной неoadъювантной системной химиотерапии в комбинации с двойной HER2-блокадой трастузумабом и пертузумабом [140].

*Трастузумаб дерукстекан (T-DXd, Enhertu®, ранее DS-8201a)* является новым многообещающим HER2-направленным терапевтическим препаратом, разработанным для улучшения характеристик конъюгатов «антитело-лекарственное средство». Трастузумаб дерукстекан представляет собой молекулу трастузумаба, конъюгированную с дерукстеканом (DXd), ингибитором ДНК-топоизомеразы I, через малеимидный тетрапептидный линкер (Gly-Gly-Phe-Gly), избирательно расщепляемый катеписинами, активность которых повышена в раковых клетках и в опухолевом микроокружении. После высвобождения внутри клетки цитотоксин дерукстекан связывается с расщепляемыми топоизомеразой I ДНК-комплексами и стабилизирует их, что приводит к индукции двухцепочечных разрывов ДНК и апоптозу клетки. Трастузумаб дерукстекан обладает соотношением цитотоксина к антителу (DAR) равным 8, что более чем в 2 раза превышает DAR трастузумаба эмтанзина, и обеспечивает мощный

цитостатический эффект. Кроме того, дерукстефан обладает высокой проницаемостью через мембрану, что позволяет оказывать цитотоксическое воздействие посредством «эффекта свидетеля» на опухолевые клетки в непосредственной близости от клеток-мишеней, независимо от их уровня экспрессии HER2. Данные особенности способствуют противоопухолевому эффекту препарата как при опухолях с высоким уровнем экспрессии HER2, так и в новообразованиях с низкой экспрессией [122]. Дополнительно было обнаружено усиление противоопухолевого иммунитета: исследование с использованием иммунокомпетентной мышинной модели с опухолью человека, экспрессирующей HER2, на клеточной линии CT26.WT показало повышенную экспрессию CD86 на дендритных клетках, повышенную экспрессию PD-L1 и главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I в опухолевых клетках с последующим отторжением опухолевых клеток адаптивными иммунными клетками [11, 195]. Основываясь прежде всего на результатах исследования II фазы DESTINY-Breast01, трастузумаб дерукстефан был одобрен FDA в 2020 г. в рамках ускоренного одобрения для лечения пациентов с неоперабельным или метастатическим HER2-положительным раком молочной железы, получивших две или более линии анти-HER2-терапии [128, 196]. В исследовании III фазы с активным контролем DESTINY-Breast03 монотерапия трастузумабом дерукстефаном показала практически в 4 раза большую эффективность по сравнению с монотерапией трастузумабом эмтанзином [197].

Механизмы действия основных препаратов HER2-направленной терапии схематично изображены на рисунке 1.



mAb – моноклональное антитело, ИТК – ингибиторы тирозинкиназ, ADC – конъюгат «антитело-лекарственное средство», HER 1-4 – рецептор эпидермального фактора роста человека (тип 1-4), ЦА – цитотоксический агент, DXd – дерукстекан, DM1 – эмтанзин

Рисунок 1 – Схематическое представление механизмов действия основных классов препаратов HER2-направленной терапии

#### 1.4 Структура таргетных терапевтических конъюгатов

Конъюгаты антител с лекарственным средством представляют собой моноклональное антитело, ковалентно связанное с низкомолекулярным цитотоксическим агентом посредством синтетического линкера. Антитело, в результате связывания с целевой мишенью на поверхности опухолевой клетки и

последующей интернализации конъюгата, высвобождает высокоэффективный цитотоксический агент внутрь опухолевой клетки, обеспечивая её гибель [7, 36].

Выбор структурных компонентов и их правильное сочетание в одной терапевтической молекуле является ключом к созданию успешного лекарственного препарата. В таблице 1 приведены структура и краткая характеристика одобренных к применению терапевтических таргетных конъюгатов ADC.

Таблица 1 – Структура и краткая характеристика одобренных к применению терапевтических таргетных конъюгатов

Название (торговое название, компания)	Мишень	мкАТ, тип, подкласс	Линкер	Цитотоксический агент (DAR)	Показание	Год одобрения
Гемтузумаб озогамицин (Mylotarg®, Pfizer)	CD33	Гуманизированное (IgG4)	Гидразоновый	<i>N</i> -ацетил гамма- калихеамицин (2–3)	CD33 положительный ОМЛ	2000 (FDA) отозван в 2010 г. повторно одобрен в 2017 г., 2018 (ЕС) 2022 (РФ)
Брентуксимаб ведотин (Adcetris®, Takeda Pharmaceutical (EU)/Seagen (FDA))	CD30	Химерное (IgG1)	mc-Val-Cit-PABC	ММАЕ (4)	Лимфома Ходжкина	2011 (FDA) 2012 (ЕС) 2016 (РФ)
Трастузумаб эмтанзин (Kadcyla®, Roche)	HER2	Гуманизированное (IgG1)	SMCC (нерасщепляемый тиоэфирный)	DM1 (3,5)	HER2- положительный рак молочной железы	2013 (FDA и ЕС) 2017 (РФ)
Инотузумаб озогамицин (Besponsa®, Pfizer)	CD22	Гуманизированное (IgG4)	Гидразоновый	<i>N</i> -ацетил-гамма- калихеамицин (6)	В-клеточный ОЛЛ	2017 (FDA и ЕС) 2019 (РФ)
Полатузумаб ведотин (Polivy®, Roche)	CD79b	Гуманизированное (IgG1)	mc-Val-Cit-PABC	ММАЕ (3,5)	Диффузная В- крупноклеточной лимфома	2019 (FDA) 2020 (ЕС, РФ)
(Padcev®, Astellas Pharma)	Нектин-4	Человеческое (IgG1)	mc-Val-Cit-PABC	ММАЕ (3,8)	Местно- распространенный или метастатический уротелиальный рак	2019 (FDA) 2022 (ЕС) 2023 (РФ)

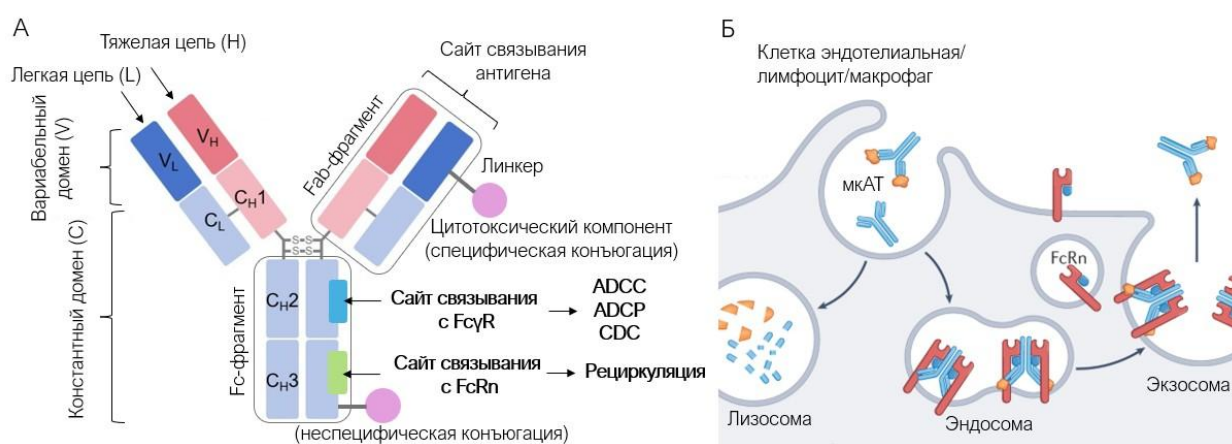
## Продолжение Таблицы 1

Трастузумаб дерукстекан (Enhertu®, Daiichi Sankyo)	HER2	Гуманизированное (IgG1)	mc-Gly-Gly-Phe-Gly	Дерукстекан (8)	HER2-положительный рак молочной железы	2019 (FDA) 2021 (EC) 2022 (РФ)
Сацитузумаб говитекан (Trodelvy®, Gilead Sciences)	Троп-2	Гуманизированное (IgG1)	CL2A (кислотно-расщепляемый)	СН-38 (7,6)	Метастатический трижды негативный рак молочной железы	2020 (FDA) 2021 (EC)
Белантамаб мафодотин (Blenrep®, GlaxoSmithKline)	BCMA	Гуманизированное (IgG1)	Mc (нерасщепляемый малеимидно-капроиловый)	ММАF (4)	Рецидивирующая или рефрактерная множественная миелома	2020 (FDA и EC) отозвано в 2023 г.
Лонкастуксимаб тезилин (Zynlonta®, ADC Therapeutics)	CD19	Химерное (IgG1)	mc-PEG8-Val-Ala-PABC	SG3199 (2,3)	Диффузная В-крупноклеточной лимфома	2021 (FDA) 2022 (EC)
Тисотумаб ведотин (Tivdak®, Genmab/Seagen)	Тканевый фактор	Человеческое (IgG1)	Val-Cit	ММАЕ (4)	Рак шейки матки	2021 (FDA)
Диситамаб ведотин (Aidixi®, RemeGen)	HER2	Гуманизированное (IgG1)	mc-Val-Cit-PABC	ММАЕ (4)	Местно-распространенный или метастатический рак желудка в Китае	2021 (NMPA) 2021 (FDA)
Мирветуксимаб соравтанзин-гинкс (Elahere®, ImmunoGen)	FR $\alpha$	Химерное (IgG1)	Сульфо-SPDB	DM4 (3,4)	FR $\alpha$ -положительный эпителиальный рак яичников, маточных труб или первичный рак брюшины	2022 (FDA) 2024 (EC)

### 1.4.1 Молекула-носитель

В течение последних 20–30 лет достижения генно-инженерной технологии получения мкАТ и создание комбинаторных библиотек генов способствовало бурному развитию таргетной терапии. Молекулы мкАТ представляют собой крупные глобулярные белки (~150 кДа), структурно состоящие из двух идентичных тяжелых полипептидных цепей (H-цепи, ~50-77 кДа) и двух идентичных легких полипептидных цепей (L-цепи, ~24 кДа), образующих Y-образную структуру и стабилизируемых внутри- и межцепочечными дисульфидными связями. Функционально мкАТ содержит три дискретных фрагмента, соединенных гибкой «шарнирной» областью. Два антигенсвязывающих Fab-фрагмента (Fragment antigen binding), состоят из легкой и тяжелой цепи ( $V_H$  и  $V_L$ ) вместе с ближайшими к ним константными доменами ( $C_{H1}$  и  $C_{L1}$ ) и отвечают за связывание со специфической молекулярной мишенью с высокой авидностью. Остальная часть C-концевых константных доменов тяжелых цепей ( $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ ) образуют кристаллизующийся Fc-фрагмент (Fragment crystallizable), содержащий домены связывания с неонатальным рецептором Fc-фрагментов антител (FcRn) и клеточным рецептором Fc-фрагментов антител (FcγR) [3, 94]. Структурное строение и функции доменов мкАТ представлены на рисунке 2А. Связывание с FcRn обеспечивает FcRn-опосредованную рециркуляцию, значительно увеличивающую период полувыведения мкАТ по сравнению с другими белками плазмы крови (~ 21 дня) (рисунок 2Б) [192]. Связывание Fc-фрагмента мкАТ с Fcγ-рецепторами приводит к активации клеточных ответов, таких как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). ADCC считается основным механизмом

действия многих терапевтических мкАТ. Способность мкАТ запускать иммунные эффекторные функции может обеспечить преимущество за счет значимого вклада дополнительной, не зависимой от воздействия связанного цитотоксина, противоопухолевой активности. С другой стороны, это может являться недостатком за счет секвестрации терапевтического конъюгата через иммунные клетки в кровотоке, влияния на связывание и целевую интернализацию конъюгата опухолевыми клетками или за счет интернализации мкАТ иммунными клетками, что может приводить к нецелевой токсичности [94, 185].



Fc $\gamma$ R – клеточные рецепторы Fc-фрагментов антител, FcRn – неонатальные рецепторы Fc-фрагментов антител, ADCC – антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, ADCP – антителозависимый клеточный фагоцитоз, CDC – комплемент-зависимая цитотоксичность

Рисунок 2 – Структурное строение и функции доменов мкАТ (А) и схематическое представление клеточного механизма FcRn-опосредованной рециркуляции мкАТ и иммунных комплексов (Б). Адаптировано из [192]

Несмотря на высокую аффинность связывания с мишенью, специфичность и терапевтический вклад ADCC, обеспечивающие успешное клиническое применение, у мкАТ, используемых в качестве носителя цитотоксической нагрузки, существует ряд недостатков – нелинейное распределение и выведение, иммуногенность, побочные токсические явления,

низкая химическая и термическая стабильность, сложность производства, основываемая высокой стоимостью и рядом требований к клеточным системам экспрессии [89].

#### **1.4.2 Альтернативные каркасные белки в качестве нацеливающей молекулы**

Альтернативные каркасные белки (АКБ) или скаффолды — это искусственно созданные или модифицированные малые белковые молекулы в виде компактной и относительно жесткой пространственной структуры — каркаса. АКБ разработаны для высокоаффинного специфического связывания с молекулами-мишенями. Использование малых каркасных белков в качестве носителей цитотоксинов обеспечивает ряд ключевых преимуществ. Компактный размер скаффолдов (6–20 кДа) способствует их эффективному нацеливанию на мишень и проникновению в солидные опухоли. АКБ характеризуются широким спектром молекулярных мишеней, низкой иммуногенностью ввиду отсутствия Fc-фрагмента, упрощенным и относительно экономичным производством в бактериальных системах экспрессии и высокой стабильностью. Другой привлекательной чертой является гибкость молекулярного дизайна АКБ с возможностью белково-инженерных манипуляций, позволяющая создавать мультивалентные конструкции, производить сайт-специфическую конъюгацию, вводить радионуклидные или флуоресцентные метки [2]. Использование АКБ в качестве нацеливающей молекулы может позволить снизить стоимость терапии и повысить её эффективность за счет улучшенной фармакокинетики и эффективного нацеливания [6]. Схематическая иллюстрация структур различных АКБ в сравнении с мКАТ представлена на рисунке 3. Основные

классы АКБ, используемые в качестве нацеливающих молекул, и краткая характеристика их структур представлены в таблице 2.

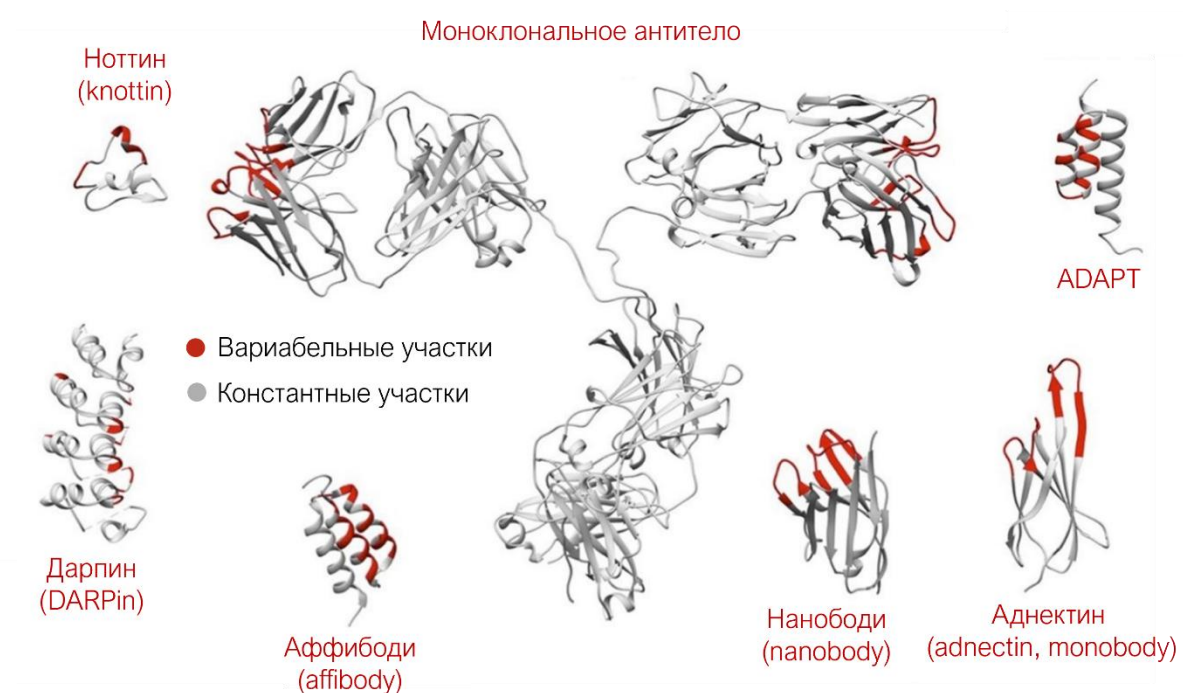


Рисунок 3 – Схематическая иллюстрация структур АКБ в сравнении с мкАТ. Размеры структур указаны относительно друг друга. Адаптировано из [166]

Таблица 2 – Основные классы АКБ и краткая характеристика их структур

Класс АКБ	Исходный протеин	Структура	Число а.о. / молекулярная масса	Варьируемый участок
Авимер (avimer)	A-домен рецепторов клеточной поверхности (рецептор липопротеинов низкой плотности (LRP), рецептор липопротеинов очень низкой плотности (VLDLR))	Олигомер (мономер – A-домен), 4 петли	A-домен – 35 а.о./~4 кДа	21 а.о. в каждом домене
Аднектин (adnectin, monobody)	10 домен человеческого фибронектина III типа ( $^{10}$ F $_{n3}$ )	$\beta$ -сэндвич	94 а.о./~10 кДа	2–3 петли
Антикалин (anticalin)	Липокалин	$\beta$ -бочонок	160–180 а.о./16–19 кДа	16–24 а.о. в каждой петле

## Продолжение Таблицы 2

Аффибоди (affibody)	В-домен стафилококкового белка А	3 $\alpha$ -спирали	58 а.о./6–7 кДа	13 а.о. на спиралях 1 и 2
ADAPT (ABD-Derived Affinity Proteins)	Альбуминсвязывающий домен протеина стрептококка G	3 $\alpha$ -спирали	46–59 а.о./5–7 кДа	2 петли
Дарпин (DARPin)	Естественные анкириновые повторы	2–3 анкириновых повтора, каждый повтор – $\beta$ -тяж и 2 $\alpha$ -спирали	33 а.о. в каждом повторе/14–17 кДа	6 а.о. в каждом повторе
Домен типа ингибитора Кунитца	Активный центр ингибиторов протеаз типа Кунитца	$\beta$ -лист, 2 $\alpha$ -спирали	58 а.о./~7 кДа	1–2 петли
Ноттин (Knottin)	Ноттины	3 $\beta$ -тяжа	30 а.о./ <4 кДа	1 петля

Производство скаффолдов состоит из двух основных этапов. Первым этапом получения АКБ является создание комбинаторной библиотеки генов посредством целевого или случайного мутагенеза родительского белка. Методом ПЦР производится наработка наборов вариантов гена АКБ, содержащих случайную последовательность нуклеотидов в участках, кодирующих переменные аминокислотные остатки. Выбор участка для рандомизации определяется структурой конкретного АКБ. На втором этапе происходит скрининг полученных наборов генов посредством фенотипического отбора в различных системах экспрессии, таких как фаговый, дрожжевой, бактериальный дисплей или в бесклеточных системах дисплея рибосомы/мРНК. Процесс селекции обычно повторяется несколько циклов с целью повышения доли молекул с заданными характеристиками. Все используемые в настоящее время методы отбора основываются на связи между генотипом (кодирующей последовательностью) и фенотипом (связывающей активностью) белка, что позволяет легко идентифицировать и

амплифицировать отобранные полипептиды при помощи кодирующих их ДНК или РНК [1].

АКБ можно классифицировать по происхождению (производные иммунных белков, белков бактериального происхождения, человека, млекопитающих или беспозвоночных), структуре (первичная/вторичная структура на основе повторов, спиралей или  $\beta$ -слоев), функциям и размерам. В зависимости от структуры выделяют АКБ с лиганд-связывающими аминокислотами в открытых петлях и АКБ с лиганд-связывающими аминокислотами во вторичной структуре [168].

*Категория I: АКБ с лиганд-связывающими аминокислотами в открытых петлях*

АКБ в этой категории включают аднектины, антикалины, авимеры, финомеры, домены типа ингибитора Кунитца и ноттины. Ряд из них исследовался в качестве нацеливающих молекул для противоопухолевой терапии, в частности, аднектины и антикалины.

*Аднектины (Adnectin, monobody).* Иммуноглобулиноподобные терапевтические АКБ, полученные из 10-го домена человеческого фибронектина III типа ( $^{10}\text{Fn3}$ ), также называемые монотелами (монободи). Первоначальная функция  $^{10}\text{Fn3}$  в фибронектине заключается в связывании интегринов.  $^{10}\text{Fn3}$  представляет собой мономерный белок из 94 аминокислотных остатков (а.о.), каркас которого состоит из Ig-складки со структурой  $\beta$ -сэндвича (два набора антипараллельных  $\beta$ -слоев), соединенной шестью петлями. Данный АКБ структурно напоминает переменные домены антител, однако  $^{10}\text{Fn3}$  характеризуется меньшим размером, низкой иммуногенностью, а также не имеет дисульфидов или свободных цистеинов, что обеспечивает высокую термостабильность. С использованием синтетических библиотек, созданных *in vitro*, были выбраны высокоаффинные лиганды для ряда молекулярных мишеней, в том числе опухоле-ассоциированных. Аднектин СТ-322, ингибитор рецептора фактора роста

эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), прошел клиническое испытание фазы I и продемонстрировал целевую активность и умеренную токсичность [151]. Однако исследование фазы II, проведенное с СТ-322 при рецидивирующей глиобластоме было прекращено до достижения запланированного набора для всех групп лечения, поскольку данные из завершенной группы монотерапии СТ-322 в дозе 2 мг/кг не достигли заданного порога эффективности [150].

*Антикалины (Anticalins).* Данный класс АКБ получен из липокалинов, группы секретируемых белков, обычно транспортирующих гидрофобные соединения. Каркас антикалина (120 а.о., 20 кДа) представляет собой структуру  $\beta$ -бочонка, состоящую из восьми антипараллельных  $\beta$ -нитей, расположенных вокруг центральной оси. Карман для связывания с лигандами расположен на конце  $\beta$ -бочонка и представлен четырьмя петлями с подвижной структурой, содержащими от 16 до 24 рандомизированных аминокислот в каждой петле. Антикалины не гликозилированы, не имеют дисульфидных связей, термостабильны [168]. ПЭГилированный антикалин PRS-050B (Angiocal), антагонист фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), в клиническом испытании I фазы у пациентов с запущенными солидными опухолями показал целевое воздействие и хорошую переносимость в дозе не менее 10 мг/кг [84].

*Категория II: АКБ с лиганд-связывающими аминокислотами во вторичной структуре*

АКБ в этой категории, находящиеся в настоящее время на стадии клинической разработки для терапевтического применения, включают дарпины (DARPin) и аффибоды.

*Дарпины (DARPin, Designed Ankyrin Repeat Protein).* Данный класс АКБ основан на природных доменах анкириновых повторов, часто являющихся посредниками внутриклеточных белок-белковых взаимодействий. Каркас дарпинов состоит из 4–6 повторяющихся блоков по 33 аминокислоты, каждый из которых организован как  $\beta$ -поворот и две антипараллельные  $\alpha$ -спирали [69].

Молекулярная масса составляет 14–18 кДа в зависимости от количества повторов. Аминокислоты как в спиральных, так и в петлях могут быть рандомизированы для высокоаффинного связывания с мишенями [116]. Триспецифический дарпин MP0250, ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста гепатоцитов (HGF), также связывающий человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) для увеличения периода полувыведения, в сочетании с бортезомибом и дексаметазоном показали эффективность возможной терапии у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой в клиническом исследовании фазы 1b/2 [15]. Дарпин MP0274, содержащий домены для связывания с HER2 и HER3 и ингибирующий нисходящую HER2- и HER3-опосредованную сигнализацию, продемонстрировал превосходящую противоопухолевую активность по сравнению с трастузумабом и лапатинибом и эквивалентную эффективность по сравнению с комбинацией трастузумаба и пертузумаба в моделях ксенотрансплантатов, экспрессирующих HER2 в груди и желудке, полученных от пациентов. Также продемонстрирован случай устойчивой регрессии опухоли при применении MP0274 в клинических условиях при HER2-позитивном МРМЖ после предшествующего лечения трастузумабом и пертузумабом [10].

### 1.4.3 Аффибоды в качестве нацеливающей молекулы

*Аффибоды (Affibody)*. Аффибоды представляют собой структуру Z-домена, образованного тремя  $\alpha$ -спиралями, полученного из IgG-связывающего В-домена стафилококкового белка А (58 а.о, 6,5 кДа). Комбинаторная библиотека для высокоаффинного связывания с целевыми мишенями создана путем рандомизации 13 аминокислот, расположенных на спиральных 1 и 2, обычно участвующих в связывании Fc-домена иммуноглобулинов (рисунок

4А) [47]. Отбор с помощью фагового дисплея позволяет нарабатывать молекулы аффибоды со средством в наномолярном диапазоне. Созревание аффинности позволяет увеличить средство от нескольких нМ до нескольких пМ [194]. Одним из преимуществ молекулы является отсутствие в каркасе цистеинов и возможность гомогенной сайт-специфической модификации путем введения уникального цистеина, в частности, для осуществления сайт-специфической маркировки, например, различными радионуклидами и флуоресцентными красителями (рисунок 4А) [59].

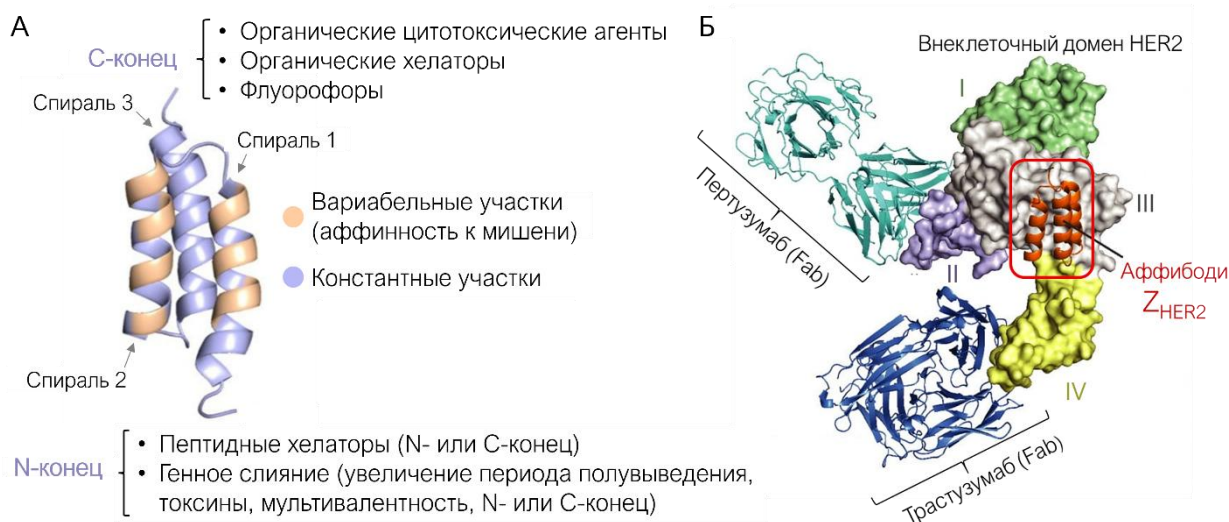


Рисунок 4 – Схематическая структура аффибоды  $Z_{HER2}$  и примеры сайт-специфической модификации молекулы (А); кристаллическая структура комплекса и эпитопы связывания между внеклеточным доменом HER2 и молекулами аффибоды  $Z_{HER2}$ , трастузумабом и пертузумабом (Б).

Адаптировано из [13, 177, 178]

Аффибоды разработаны для широкого спектра опухолеассоциированных молекулярных мишеней и в доклинических условиях показали перспективность в качестве диагностических нацеливающих молекул для таких мишеней, как HER2 (рисунок 4Б) [203], EGFR [112], HER3 [26], рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1, IGF-1R) [113], рецептор тромбоцитарного фактора роста  $\beta$ -типа (PDGFR $\beta$ ) [114], рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 типа (VEGFR2) [160], лиганд рецептора

запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-L1) [119] и карбоангидраза IX (CAIX) [56].

Молекулы аффибоди успешно продемонстрировали свою эффективность в качестве нацеливающих молекул в доклинических и в клинических исследованиях I и II фазы, преимущественно как носители радионуклидов для диагностического применения, в частности аффибоди [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-ABY-025 (тезатабеп матракетан) [48, 110, 111, 126, 135], [ $^{18}\text{F}$ ]F-GE-226 [187] для ПЭТ и [ $^{111}\text{In}$ ]In-ABY-002 [139], [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2:41071</sub> [152] для ОФЭКТ визуализации HER2-положительного метастатического РМЖ, а также  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-MAL-MZHER2 для ПЭТ визуализации HER2-положительных карциномы желудка или гастроэзофагеальной карциномы [24, 117]. Аффибоди ABY-025 связывается с эпитопом, отличным от эпитопа связывания терапевтических мкАТ трастузумаба и пертузумаба, следовательно, применение данного лиганда для визуализации не осложняется проводимой параллельно антиHER2-терапией. В исследованиях не сообщалось о проблемах безопасности, связанных с ABY-025, что подтверждает перспективность применения аффибоди в качестве молекулы-носителя. Малый размер молекулы (6–7 кДа) позволяет получать высококонтрастные изображения в течение нескольких часов после инъекции, дифференцировать метастазы, оценивать статус HER2 поражений, недоступных для биопсии, а также оценивать гетерогенность экспрессии HER2 в опухоли [24].

Терапевтическое действие с использованием белковых молекул аффибоди может осуществляться напрямую путем блокирования взаимодействий «лиганд-рецептор», либо же путем функционализации молекул аффибоди посредством связывания с фрагментами, увеличивающих время нахождения молекулы в плазме крови, и цитотоксичными молекулами, в качестве которых могут выступать радионуклиды, токсические домены (экзотоксины) или низкомолекулярные цитотоксические агенты. Молекулы аффибоди, как малые пептидные молекулы, обладают размером, не

превышающим порог почечной фильтрации (60–70 кДа), и быстро выводятся из кровотока. Быстрый клиренс выгоден для диагностического применения, но для терапии требуется более длительное время пребывания молекулы в крови. Исключением является радиотерапия, где длительное время пребывания циркулирующего конъюгата приводит к увеличению облучения радиочувствительного костного мозга, что является основной проблемой радиоиммунотерапии с использованием полноразмерных мкАТ [82]. Для терапевтического применения молекул аффибоды и их оптимального биораспределения необходимо увеличить размер молекулы. Стратегии, используемые для малых пептидных молекул, указаны в разделе 1.4.5. Одной из успешно применяемых стратегий является слияние белковой молекулы с крупными фрагментами, такими как альбумин-связывающий домен (ABD) с фемтомолярной аффинностью к ЧСА. Одним из первых разработанных и исследованных *in vivo* HER2-направленных терапевтических агентов на основе аффибоды был терапевтический агент на основе димерной молекулы аффибоды  $Z_{\text{HER2}:342}$ , слитой с ABD и меченной терапевтическим нуклидом  $^{177}\text{Lu}$  –  $^{177}\text{Lu}\text{-CHX-A''-DTPA-ABD-(Z}_{\text{HER2}:342})_2$ . Слияние с ABD позволило в 25 раз снизить почечный захват по сравнению с исходной димерной молекулой  $(Z_{\text{HER2}:342})_2$  и сохранить высокий и специфичный захват конъюгата в HER2-экспрессирующих опухолях, продемонстрировав выраженный противоопухолевый эффект в микрометастатической модели рака молочной железы *in vivo* [162]. Новая молекула  $Z_{\text{HER2}:2891}\text{-ABD}_{035}\text{-DOTA}$ , обозначенная как ABY-027, создана на основе аффибоды  $Z_{\text{HER2}:2891}$ , слитого на N-конце с  $\text{ABD}_{035}$  и конъюгированного на C-конце через уникальный цистеин с малеимидопроизводным DOTA для радиомечения  $^{177}\text{Lu}$  или  $^{111}\text{In}$ . Данная конструкция продемонстрировала в 2 раза более высокое поглощение опухолью и в 3 раза более низкое удержание радиоактивности в почках по сравнению с предшествующим вариантом [169]. Терапевтическое исследование *in vivo* на мышах с ксенотрансплантатами SKOV3 с

использованием молекулы аффибоди [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-ABY-027 отдельно и в сочетании с трастузумабом показала многообещающие результаты. Монотерапия с [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-ABY-027 улучшала выживаемость мышей (медиана выживаемости составила 77 дней) и превосходила в эффективности ( $p < 0,01$ , тест Мантеля–Кокса) результаты монотерапии трастузумабом (медиана выживаемости – 55,5 дней). Комбинация методов лечения с использованием [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-ABY-027 и трастузумаба улучшила результаты лечения по сравнению с монотерапией этими агентами (на 90 день исследования медиана выживаемости не была достигнута) с полной ремиссией опухолей у 2 из 8 мышей [161]. В следующем варианте терапевтического HER2-направленного аффибоди [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PEP49989 молекула  $Z_{\text{HER2}:2891}$  была также конъюгирована посредством С-концевого цистеина с хелатором DOTA, однако на N-конце молекулы был использован деиммунизированный вариант ABD (ABD\*). [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PEP49989 специфично связывался с клетками, экспрессирующими HER2 *in vitro* и *in vivo*. Аффинность связывания [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PEP49989 с HER2 было аналогично аффинности [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-ABY-027, содержащего родительский вариант ABD<sub>035</sub>. Почечное поглощение [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PEP49989 было в 1,4 раза выше, но накопление в печени и селезенке определено в 1,7–2 раза ниже по сравнению с [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-ABY-027. Медианная выживаемость мышей с ксенотрансплантатами SKOV3, получавших [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PEP49989 (> 90 дней), была значимо выше ( $p < 0,0005$ , тест Мантеля–Кокса), чем выживаемость мышей, получавших контроль (38 дней) или трастузумаб (45 дней). Лечение с использованием комбинации [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PEP49989 и трастузумаба увеличило количество полных ремиссий опухолей. Степени нефро- и гепатотоксичности были минимальными или легкими [73]. В числе терапевтических средств на основе аффибоди, меченных радионуклидами, также была рассмотрена молекула [ $^{188}\text{Re}$ ]Re- $Z_{\text{HER2}:41071}$ . Выбор рения-188 был обусловлен сходством химических свойств и профилем биораспределения с технецием-99m, а также благоприятного биораспределения *in vivo* диагностического агента [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-

Z<sub>HER2:41071</sub>, который к настоящему времени прошел I фазу клинических испытаний [77, 152]. Экспериментальная радионуклидная терапия с использованием [<sup>188</sup>Re]Re-Z<sub>HER2:41071</sub> повысила выживаемость мышей с ксенотрансплантатами SKOV3 (медианная выживаемость составила 68 дней для [<sup>188</sup>Re]Re-Z<sub>HER2:41071</sub> по сравнению с 29 днями для немеченного Z<sub>HER2:41071</sub>) без токсичности для почек, которые являются критическим органом [77].

Иммунотоксин Affitoxin, в котором молекула аффибоди Z<sub>HER2:342</sub> слита с PE38, укороченной версией экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa* (PE), показал специфичное связывание и наномолярное сродство к HER2-экспрессирующим клеточным линиям, при этом концентрация полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) для клеток MCF7/HER2 с повышенной экспрессией HER2 составила 62,7 ± 5,9 фМ [27]. В терапевтических исследованиях *in vivo* в дозе 0,1 мг/кг показал уничтожение крупных опухолей BT-474 и значительное воздействие на опухоли SKOV3 и NCI-N87 [102]. Однако, иммунотоксин имел короткий период полувыведения, не способный снизить потенциальные побочные эффекты. Новый трехкомпонентный таргетный токсин, полученный путем слияния аффибоди Z<sub>HER2:2891</sub>, деиммунизированного токсина PE38X8 и ABD<sub>035</sub> показал цитотоксичность (IC<sub>50</sub>) в HER2-экспрессирующих клетках в диапазоне от 6 до 300 пМ, где короткая инкубация в течение 10 минут приводила к существенному уничтожению клеток [182]. Проблемой биораспределения *in vivo* иммунотоксинов на основе каркасных белков является высокое накопление в печени, обусловленное влиянием молекулы иммунотоксина. Добавление гидрофильной гистидин-глутаматной метки (HE)<sub>3</sub>, привело к снижению накопления в печени на 20 % для (HE)<sub>3</sub>-Z<sub>HER2</sub>-ABD-PE38X8 [123]. Также был изучен иммунотоксин на основе каркасных белков аффибоди и ADAPT6, Z<sub>HER2:2891</sub>-ADAPT<sub>6</sub>-ABD-PE25, который в исследованиях *in vitro* продемонстрировал цитотоксичность в HER2-экспрессирующих клеточных линиях от 10 до 100 пМ и высокое почечное удержание *in vivo* [105].

Примером исследованного в доклинических условиях конъюгата аффибоди с низкомолекулярным цитотоксическим агентом является молекула  $Z_{\text{HER2:2891}}$ , конъюгированная с эмтанзином (DM1). Первоначально был изучен конъюгат на основе димерной молекулы  $(Z_{\text{HER2:2891}})_2\text{-Cys}$  в сравнении с димерной молекулой, слитой с ABD,  $(Z_{\text{HER2:2891}})_2\text{-ABD-Cys}$ . Сильный цитотоксический эффект конъюгатов *in vitro* на клетках SKBR3 и AU565 (значения  $IC_{50}$  варьировались от 0,27 до 0,47 нМ) был сопоставим с трастузумабом эмтанзином ( $IC_{50} = 0,21$  нМ на молекулу препарата). Конъюгаты продемонстрировали специфичность воздействия на опухоль *in vivo* и значительное продление выживаемости в сравнении с контрольными конструкциями в терапевтическом исследовании на мышах с ксенографтами опухоли SKOV3, где медиана выживаемости для  $(Z_{\text{HER2:2891}})_2\text{-ABD-mcDM1}$  в дозе 8,5 мг/кг составила 58 дней. Слияние с ABD значимо увеличивало время пребывания в крови с 3 до 14 часов, но менее, чем для аналогичной конструкции, слитой с ABD молекулы  $Z_{\text{HER2:342}}$  без эмтанзина (с 0,6 до 36 часов). Кроме того, для конструкций были определены нежелательные высокие показатели поглощения в органах выведения – печени, обусловленное, вероятно, гидрофобной природой цитотоксина mcDM1, и почках. Гистологическое исследование не выявило патологических изменений в данных органах несмотря на то, что поглощение почками было выше, чем поглощение опухолью [25]. Для снижения накопления в печени были разработаны аналогичные конструкции с включением полярных и отрицательно заряженных остатков глутамата (Glu-Glu-Glu и Glu-Glu-Glu-Glu-Glu) вблизи места конъюгации mcDM1. Сравнительное исследование биораспределения показало, что добавление глутаматов снизило накопление препарата в печени, сохранив при этом поглощение опухолью [121]. Новый конъюгат на основе моновалентного аффибоди  $Z_{\text{HER2:2891}}\text{-ABD-E}_3\text{-mcDM1}$  в дозах 10,3 мг/кг и 15,1 мг/кг продемонстрировал наиболее эффективную регрессию HER2-экспрессирующих человеческих опухолей,

имплантированных мышам, с исчезновением опухолей у некоторых особей и полной выживаемостью всех мышей на конец исследования (90 дней) [64].

Привлекательным будущим терапевтическим подходом может быть объединение конъюгатов аффибоди с терапевтическими мкАТ и ADC в схемах лечения пациентов с HER2-экспрессирующими видами рака. Аффибоди  $Z_{HER2:2891}$ , пертузумаб и трастузумаб эмтанзин имеют разные сайты связывания с HER2 [174], что позволяет предположить, что эффект от применения их комбинации является синергичным, а не конкурирующим. Кроме того, отличается неспецифическое поглощение мкАТ и аффибоди здоровыми тканями, что приводит к различным нецелевым токсическим эффектам, вызванным соединениями. Таким образом, их сочетание должно приводить к меньшим общим побочным эффектам при том же терапевтическом эффекте по сравнению с монотерапией. Интересным аспектом для дальнейшего изучения является также то, что молекулы антител и аффибоди имеют значительную разницу в молекулярной массе (150 и 7 кДа, соответственно), а также различное сродство к HER2, что обуславливает разные свойства проникновения в солидные опухоли. Вероятно, что их характер распределения в опухолях будет отличаться, что приведет к более эффективной терапии, чем любое из этих соединений по отдельности [193].

#### 1.4.4 Низкомолекулярные цитотоксические агенты

Химиотерапевтический агент, используемый в таргетном конъюгате, должен отвечать комплексу требований, первым из которых является чрезвычайно высокая цитотоксичность при низких концентрациях. Ввиду ограниченной экспрессии опухолеспецифических антигенов, особенно в солидных опухолях, низкой скорости интернализации молекулы-носителя в опухолевые клетки (скорость поглощения мкАТ опухолью менее 0,003–0,08 %

от введенной дозы на грамм) [52, 108], а также ограниченного количества цитотоксина, способной доставляться молекулой-носителем – количество молекул цитотоксического агента, которые могут быть эндоцитированы в опухолевые клетки также ограничено. Поэтому цитотоксические соединения, используемые в терапевтических конъюгатах, характеризуются в 100–1000 раз более высокой эффективностью по сравнению со стандартными химиотерапевтическими препаратами, достигая субнаномолярных и пикомолярных значений  $IC_{50}$ . Другими немаловажными требованиями являются стабильность цитотоксина в плазме крови, среде эндосом и лизосом с низким pH; наличие функциональной группы, предназначенной для связывания с адресной молекулой посредством линкера и доступной для модификаций без значительного влияния на эффективность; низкая иммуногенность. Для осуществления «эффекта свидетеля» перспективными являются гидрофобные низкомолекулярные цитотоксические молекулы, способные проникать через клеточные мембраны. Несмотря на различные внутриклеточные мишени, большое количество цитотоксинов демонстрируют схожий механизм токсического воздействия: остановка клеточного цикла (в фазах S или G2/M, в зависимости от цитотоксина) и последующий апоптоз клетки. При этом неделящиеся клетки, покоящиеся в фазе G0, менее чувствительны к воздействию таких цитотоксинов по сравнению с быстро делящимися опухолевыми клетками [154].

### **Цитотоксические агенты, нацеленные на микротрубочки**

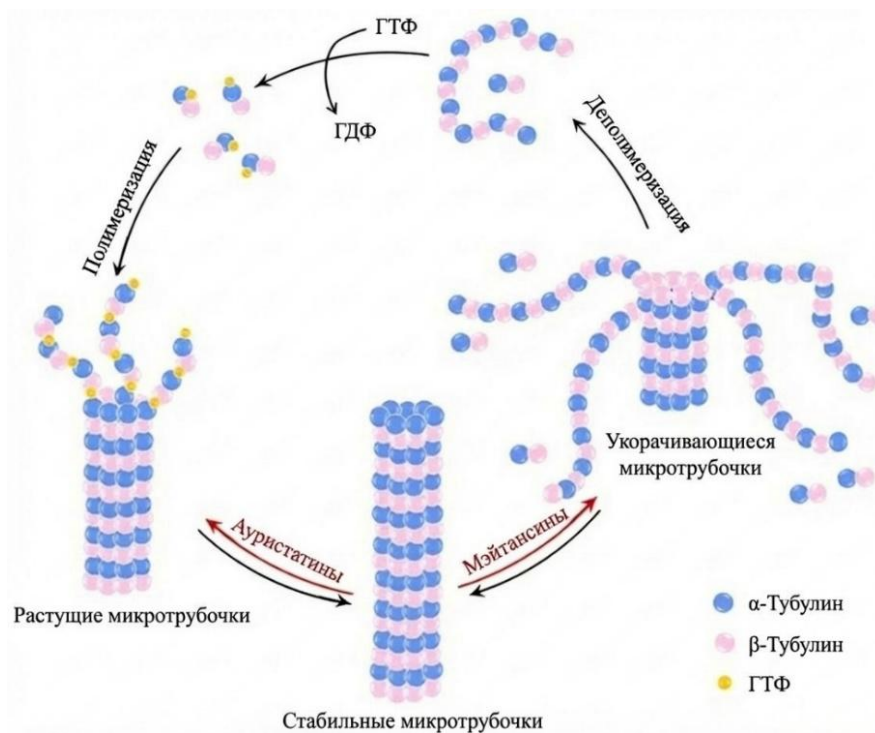
Агенты, нацеленные на микротрубочки тубулина, в соответствии с механизмами их действия, можно разделить на две основные категории: промоторы полимеризации тубулина, которые стабилизируют структуры микротрубочек (ауристатины), и ингибиторы полимеризации тубулина, которые дестабилизируют структуры микротрубочек (майтанзины).

*Ауристатины.* Ауристатины — синтетические противоопухолевые соединения на основе натурального пептида доластатина, выделенного из

беспанцирного моллюска *Dolabella auricularia* (морской заяц). Ауристатинны являются мощными цитотоксинами, нацеленными на микротрубочки, способными блокировать сборку тубулина и приводить к остановке клеточного цикла в фазе G2/M, что приводит к апоптозу делящихся клеток. Они препятствуют образованию микротрубочек путем связывания с  $\beta$ -субъединицей димеров  $\alpha$ - $\beta$  тубулина в домене связывания алкалоида барвинка. После связывания цитотоксин ингибирует гидролиз гуанозинтрифосфата (ГТФ) на  $\beta$ -субъединице, что приводит к чрезмерному и непрерывному росту микротрубочек (рисунок 5). Поскольку микротрубочки теряют способность укорачиваться и разделять сестринские хроматиды во время анафазы, клетка останавливается на стадии метафазы митоза. Структура доластатина 10 была использована в качестве основы для производных монометилауристатина E (ММАЕ) и монометилауристатина F (ММАF). Основное различие между ММАЕ и ММАF заключается в наличии остатка фенилаланина на С-конце ММАF, что способствует его непроницаемости через мембрану клетки. ММАЕ, благодаря своей гидрофобной природе, способен диффундировать из клетки-мишени и опосредовать эффекты свидетеля, вызывая гибель близлежащих клеток. Однако, ММАF более гидрофилен, имеет меньшую тенденцию к агрегации и демонстрирует меньшую системную токсичность, по сравнению с ММАЕ. Среди одобренных к применению ADC цитотоксин ММАЕ является одним из наиболее успешно используемых цитотоксических агентов и представлен в широком спектре терапевтических конъюгатов, таких как брентуксимаб ведотин (Adcetris®), полатузумаб ведотин (Polivy®), энфортумаб ведотин (Padcev®), тисотумаб ведотин (Tivdak®), диситамаб ведотин (Aidixi®). Цитотоксин ММАF содержит терапевтический конъюгат Белантамаб мафодотин (Blenrep®) [154].

*Майтанзины.* Майтанзины – семейство синтетических цитотоксинов из класса бензоансамкролидных антибиотиков, первоначально выделенных из коры эфиопского кустарника *Maytenus serrata*. Майтанзины предотвращают

полимеризацию и образование функционально активных микротрубочек посредством связывания с  $\beta$ -субъединицей тубулина в месте связывания алкалоида барвинка и вызывают остановку митоза клетки. Гидролиз молекулы ГТФ на  $\beta$ -субъединице приводит к дальнейшей разборке существующих микротрубочек, что останавливает клетку в метафазе и предотвращает деление клетки. Наиболее известными представителями данной группы на данный момент являются DM1 (эмтанзин), входящий в состав конъюгата трастузумаб эмтанзин (Kadcyla®), успешно применяемого для терапии HER2-положительного рака молочной железы, и DM4 (равтанзин), входящим в состав конъюгата мирветуксимаб соравтанзин-гинкс (Elahere®), предназначенного для лечения FR $\alpha$ -положительного эпителиального рака яичников, маточных труб или первичного рака брюшины [36, 154].



ГТФ, гуанозинтрифосфат; ГДФ, гуанозиндифосфат

Рисунок 5 – Схематический механизм действия цитотоксических агентов, нацеленных на микротрубочки тубулина. Адаптировано из [154]

### Агенты, повреждающие ДНК

Ингибиторы ДНК связываются с ДНК в малой бороздке двойной спирали и повреждают молекулу посредством ряда механизмов: двухцепочного разрыва (калихеамицины), алкилирования (пирролобензодиазепины и дуокармицины, которые также можно классифицировать как ДНК-сшиватели), интеркаляции (камптотецины и антрациклины). Агенты, повреждающие ДНК демонстрируют чрезвычайно высокую цитотоксичность (пикомолярные значения  $IC_{50}$ ) по сравнению с агентами, нацеленными на микротрубочки (субнанолярные значения  $IC_{50}$ ), что позволяет ADC воздействовать на опухолевые клетки с низким уровнем экспрессии целевых антигенов, а также проявлять эффективность в отношении солидных опухолей. Другим важным преимуществом ингибиторов ДНК является возможность оказывать цитотоксическое воздействие на протяжении всего клеточного цикла [154].

*Дуокармицины.* Дуокармицины – семейство природных антибиотических метаболитов, первоначально выделенных из бактерий рода *Streptomyces*. Дуокармицины связываются с малой бороздкой ДНК, и, образуя ковалентные связи с адениновыми основаниями в положении N3, вызывают необратимое алкилирование ДНК. Алкилирование нарушает структурную целостность ДНК, что приводит к расщеплению ДНК и, в конечном итоге, к гибели клетки посредством апоптоза. Цитотоксин дуокармицин-гидроксибензамид-азаиндол (DUBA) входит в состав терапевтического конъюгата нового поколения трастузумаба дуокармазина (SYD985), проходящего III фазу клинических исследований для терапии HER2-положительного местнораспространенного или метастатического рака молочной железы [132, 154].

*Калихеамицины.* представляют собой класс противоопухолевых антибиотиков энедиинового ряда, полученных из бактерии *Micromonospora echinospora*. Попав в ядро клетки, калихеамицины, функционально схожие с

антрациклинами, связываются с малой бороздкой ДНК и вызывают сайт-специфические двухцепочечные разрывы ДНК, что приводит к гибели клетки по механизму апоптоза. *N*-ацетил гамма-калихеамицин, производное калихеамицина, используется в конструкции конъюгатов Гемтузумаб озогамицин (Mylotarg®), используемого в качестве монотерапии для пациентов с CD33-положительным острым миелоидным лейкозом, и Инотузумаб озогамицин (Besponsa®), применяемого для терапии В-клеточный острого лимфобластного лейкоза [36, 154].

### **Ингибиторы РНК-полимеразы II**

*Аманитины.* РНК-полимераза II (Pol II) – фермент, обеспечивающий синтез предшественников матричных РНК и ряда малых ядерных РНК. Pol II – единственный тип РНК-полимеразы, транскрибирующий гены, кодирующие белки и играет ключевую роль в экспрессии генов и клеточной регуляции. Аманитины, первоначально идентифицированные в бледной поганке *Amanita Phalloides*, высокоспецифично связываются с РНК-полимеразой II и ингибируют ее действие, что приводит к резкому, более чем 1000-кратному снижению транскрипции и синтеза белка. Из аматоксинов  $\alpha$ -аманитин и  $\beta$ -аманитин наиболее изучены для применения в качестве цитотоксических агентов для ADC. Для них характерна высокая эффективность и стабильность в плазме, гидрофильность, толерантность к линкерному фрагменту без потери цитотоксичности и, что наиболее важно, способность проявлять цитотоксичность независимо от статуса пролиферации опухолевых клеток. Производное  $\alpha$ -аманитина в качестве конъюгированного токсина применяется в терапевтическом конъюгате HDP-101, нацеленного на антиген созревания В-клеток (BCMA), и находится на 1/2а фазе клинического исследования для терапии пациентов с множественной миеломой [183].

### **Ингибиторы топоизомеразы I**

Топоизомеразы регулируют степень сверхспирализации ДНК и устраняют её топологические дефекты, возникающие в ходе таких ключевых

процессов, как репликация и транскрипция. Эти каталитические ферменты расщепляют (топоизомеразы I расщепляют одноцепочечную ДНК), восстанавливают суперспирали и повторно лигируют цепи ДНК. Ингибиторы топоизомеразы специфически связываются с комплексом ДНК-топоизомераза, тем самым ингибируя механизм восстановления и приводя к повреждению ДНК и, следовательно, к апоптозу клеток. Примером клинического применения является цитотоксин DX-8951 (DXd) в терапевтических конъюгатах трастузумаб дерукстефан и сацитумаб говитекан [154].

#### 1.4.5 Линкер

Линкер в составе терапевтического конъюгата выполняет связующую функцию между носителем и цитотоксической нагрузкой. Основными требованиями к линкеру являются способность обеспечивать высокую химическую стабильность конструкции препарата в течение длительного периода ( $T_{1/2} > 1$  недели) в системном кровообращении и быстрое и эффективное высвобождение цитотоксического агента в активной форме внутри опухолевых клеток [141]. Линкеры с ограниченной стабильностью склонны вызывать неспецифическое высвобождение, приводящее к нецелевой токсичности. Выбор линкера важен, так как он способен существенно влиять на терапевтический индекс, фармакокинетику и фармакодинамику терапевтического конъюгата [172].

В зависимости от механизма высвобождения цитотоксического агента линкеры подразделяются на два основных класса: расщепляемые и нерасщепляемые.

## Расщепляемые линкеры

Расщепляемые линкеры чувствительны к внутриклеточной среде и включают химически лабильные линкеры (pH-чувствительные линкеры/кислотно-расщепляемые и восстанавливаемые/чувствительные к глутатиону дисульфидные линкеры) и расщепляемые ферментами (пептидные, расщепляемые  $\beta$ -глюкуронидазой,  $\beta$ -галактозидазой или фосфатазой).

### Химически лабильные линкеры

*pH-чувствительные линкеры/кислотно-расщепляемые.* Стабильны в щелочной среде. В кислой среде эндосом (pH = 5–6) и лизосом (pH = 4,8) подвергаются гидролизу и высвобождают цитотоксический агент. К ним относятся гидразоновые линкеры, применяемые в терапевтических конъюгатах инотузумаб озогамицин (Mylotarg) [32, 41, 90, 181], гемтузумаб озогамицин (Besponsa) [39, 55]. Однако, кислая среда характерна для ряда тканей организма, что может приводить к неспецифическому высвобождению препарата.

*Восстанавливаемые или дисульфидные линкеры, чувствительные к глутатиону.* Дисульфидные линкеры расщепляются внутриклеточным глутатионом, низкомолекулярным тиолом, присутствующий в цитоплазме (1–10 ммоль/л) и внеклеточной среде (2–20 мкмоль/л в плазме). В опухолевых клетках повышенные уровни тиолов обнаруживаются также во время стрессовых состояний, таких как гипоксия. Метаболиты дисульфидных линкеров способны диффундировать в соседние опухолевые клетки и вызывать эффект уничтожения свидетеля [34].

### Линкеры, расщепляемые ферментами

Химически лабильные линкеры часто имеют ограниченную стабильность в плазме, что может приводить к преждевременному высвобождению цитотоксина. Альтернативная стратегия применения линкеров, расщепляемых ферментами, использует повышенную

концентрацию гидролитических ферментов в клетках и препятствует внеклеточной деградации конструкции конъюгатов.

*Пептидные линкеры.* Дипептидная связь пептидных линкеров, из которых наиболее успешно применяемые валин-цитруллин (Val-Cit), фенилаланин-лизин (Phe-Lys) и валин-аланин (Val-Ala), расщепляются цистеиновой протеазой катепсином Б [51, 63], обнаруживаемой в поздних эндосомах и лизосомах. Также уровни экспрессии катепсина Б, основного участника протеолитических путей, усиливающих неопластическую прогрессию, повышены во многих опухолевых и опухоли-ассоциированных клетках [93]. Из-за неподходящих условий pH и ингибиторов сывороточной протеазы пептидные линкеры демонстрируют высокую стабильность в кровотоке с быстрым ферментативным высвобождением цитотоксина в целевой клетке. Эффективное ферментативное расщепление линкеров данного типа требует наличия в их структуре спейсерного модуля, минимизирующего стерические затруднения и обеспечивающего доступ к пептидной связи. Наиболее часто используемым для этой цели соединением является пара-аминобензилкарбамат (ПАБК), который обладает способностью к саморасщеплению, тем самым облегчая высвобождение немодифицированного цитотоксина [167].

*Линкеры, расщепляемые  $\beta$ -глюкуронидазой.* Гликозидная связь линкеров на основе  $\beta$ -глюкуроновой кислоты подвергаются расщеплению лизосомальным ферментом  $\beta$ -глюкуронидазой, в избытке присутствующем в лизосомальном компартменте клетки и, подобно катепсину В, секретлируемой в некротических областях некоторых опухолей [61].

*Линкеры, расщепляемые  $\beta$ -галактозидазой.* Галактозидные линкеры расщепляются другим классом гидролитических лизосомальных ферментов —  $\beta$ -галактозидазой [60].

### **Нерасщепляемые линкеры**

К нерасщепляемым линкерам относятся тиоэфирные и малеимидакапроильные (mc) линкеры. Они требуют полной лизосомальной ферментативной деградации молекулы-носителя до аминокислот, необходимой для высвобождения активного метаболита препарата [35]. Высвобожденный метаболит представляет собой производное препарата, которое образовано цитотоксическим агентом, линкером и аминокислотным остатком, к которому линкер был ковалентно присоединен [141]. В связи с этим при разработке терапевтического конъюгата необходимо учитывать различия в уровне оказываемого цитотоксического эффекта исходного цитотоксического агента и потенциальных метаболитов конъюгата [71, 134]. По сравнению с расщепляемыми, нерасщепляемые линкеры обладают высокой стабильностью в кровотоке, что позволяет терапевтическим конъюгатам иметь длительный период полувыведения и представлять меньший риск побочных эффектов, сохраняя при этом активность цитотоксического агента [37]. Однако заряженная природа нерасщепляемого линкера делает метаболит неспособным диффундировать через липофильную клеточную мембрану и убивать окружающие раковые клетки с помощью эффекта свидетеля [42].

#### **1.4.6 Стратегии увеличения периода полувыведения терапевтических белков**

Из-за быстрого почечного клиренса и ферментативной активности в системном кровотоке молекулы белков и пептидов имеют короткое время пребывания в крови. Для поддержания терапевтической концентрации в сывороточной среде в течение требуемого периода времени необходима инъекция более высокой дозы. Однако колеблющаяся концентрация

терапевтического белка с высоким начальным пиком создает побочные токсические эффекты. Кроме того, ряд терапевтических белковых препаратов имеет узкое терапевтическое окно. Скорость выведения препарата зависит от нескольких факторов, таких как размер, молекулярная масса, поверхностный заряд и гидрофобность. Белковые и пептидные препараты, в том числе АКБ, обладают малым размером, не превышающим размер почечного клубочка (60–70 кДа или 6 нм в диаметре), и быстро выводятся из кровотока посредством почечной фильтрации. Малый размер выгоден для быстрого проникновения в опухоль в условиях диагностического применения, но нежелателен для терапии. Увеличенный период полувыведения способен обеспечить длительное терапевтическое действие при более низких дозах.

Стратегии продления периода полувыведения терапевтических белков разнообразны, при этом большинство подходов либо связывают препарат с объемными фрагментами для увеличения гидродинамического объема биологически активной молекулы (ПЭГилирование, генетическое слияние/химическое связывание с рекомбинантными биополимерами, альбумином или альбумин-связывающими фрагментами), либо обеспечивают рециркуляцию, опосредованную FcRn (Fc-слияние). Кроме того, объемные фрагменты могут защищать молекулу от внеклеточной ферментативной деградации, обнаружения иммунной системой, а также снижать связывание с рецепторами клиренса [149].

*ПЭГилирование.* Первой общепринятой технологией для разработки препаратов пролонгированного действия стало ПЭГилирование – химическое связывание с синтетическим полимером полиэтиленгликолем (ПЭГ). На сегодняшний день имеется около 10 клинически одобренных ПЭГилированных белковых и пептидных препаратов [159]. Однако, частая потеря биологической активности ПЭГилированных молекул, высокая стоимость, полидисперсность коммерчески доступных производных ПЭГ, отсутствие биоразлагаемости полимера, способное привести к вакуолизации

почечных канальцев, а также накопленные доказательства иммуногенности ограничивают применимость технологии [33].

*Рекомбинантные биополимеры на основе аминокислот.* Альтернативным вариантом является связывание с биоразлагаемыми неструктурированными пептидными полимерами, увеличивающими период полувыведения счет увеличения размера и гидродинамического радиуса молекулы. Они имеют схожие биофизические свойства с ПЭГ, но разработаны с целью преодоления недостатков, таких как полидисперсность, иммуногенность и накопление в тканях. Генетическое слияние терапевтических белков или пептидов с такими полимерами приводит к получению гомогенных препаратов без необходимости химической модификации или этапов связывания [46].

XTEN – класс неструктурированных биоразлагаемых пептидных полимеров, состоящих из рандомизированных последовательностей шести гидрофильных, химически стабильных аминокислот – аланина (A, Ala), глутаминовой кислоты (E, Glu), глицина (G, Gly), пролина (P, Pro), серина (S, Ser) и треонина (T, Thr). XTEN экспрессируется в *E. coli*, не имеет вторичной структуры, стабилен в плазме, обладает низкой иммуногенностью, термостойкостью, высокой растворимостью и низкой склонностью к агрегации. Получены XTEN размером 864 а.о., а также в дробных размерах, включая 2/3 из 864 (576 а.о.), 1/2 (432 а.о.), 1/3 (288 а.о.) и 1/6 (144 а.о.). Возможность настройки длины полимера обеспечивает регулирование гидродинамического объема молекулы для достижения требуемого периода полувыведения [17, 81]. В доклинических условиях технология XTENилирования успешно применялась для ряда лекарственных средств, включая препараты глюкагона (Gcg-XTEN) [88], глюкагоноподобного пептида-2 (GLP2-2G-XTEN) [92], гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (XTEN-GCSF) [78]. Somavaratan (VRS-317, Amunix), пролонгированная форма рекомбинантного гормона роста человека (ГРЧ),

получен при слиянии длинного полипептида XTEN с N-концом и более короткого – с C-концом молекулы ГРЧ, завершил клинические испытания. Для VRS-317 эффективность *in vitro* снизилась примерно в 12 раз по сравнению с препаратом ГРЧ, что, вероятно, обусловлено эффектом стерического препятствия [14]. Однако, период полувыведения VRS-317 из плазмы у взрослых пациентов с дефицитом гормона роста при дозе 0,80 мг/кг составил 131 час, что в 30–60 раз больше по сравнению с введением ГРЧ, что делает возможным введение VRS-317 с интервалом вплоть до одного месяца [13, 14, 16]. Разработка VRS-317 была прекращена после 3 фазы клинического испытания, которая показала сниженную эффективность по сравнению с ежедневными инъекциями ГРЧ [131]. Efanesoctocog alfa (Altuviiiо, TM Sanofi-SOBI), основанный на одноцепочечном рекомбинантном факторе свёртывания крови VIII (rFVIII) с удаленным В-доменом, стал первым препаратом слитого белка XTEN, который получил одобрение FDA в 2023 году для лечения наследственной гемофилии А [66]. Объединив технологии XTEN и Fc-слияния, дополнительно включив слияние с фрагментом фактора Виллебранда (VWF), удалось достичь трехкратного увеличения периода полувыведения (~42 ч у детей и ~48 ч у взрослых), что позволяет вводить препарат один раз в неделю [18].

PAS представляет собой неструктурированный пептидный полимер на основе повторяющихся последовательностей, состоящих из аминокислот пролина (P, Pro), аланина (A, Ala) и/или серина (S, Ser). Технология PASилирования успешно используется в доклинических моделях для оптимизации радиоконтрастных агентов визуализации опухолей [83, 106, 138], препаратов на основе цитокинов [72, 145, 147], ферментов [60, 146], фрагментов антител [68], АКБ [120, 125], пептидов [45, 133] и пептидных или белковых гормонов [137, 148].

*Связывание с альбумином или альбумин-связывающими фрагментами.*

Сывороточный альбумин обладает уникальными благоприятными

особенностями для использования в качестве молекулы, увеличивающей период полувыведения: является наиболее распространенным белком в плазме; присутствует в концентрации 50 мг/мл (600 мкм); имеет длительный период полувыведения из плазмы (19 дней), обусловленный размером (66,5 кДа), превышающим порог почечной фильтрации, а также специфическим связыванием и рециркуляцией FcRn. Кроме того, альбумин содержит многовалентные сайты связывания с отрицательно заряженной площадью поверхности. Ковалентное связывание с альбумином путем конъюгации и прямого генетического слияния применялось к широкому спектру терапевтических белков, включая цитокины, факторы роста, гормоны, факторы коагуляции и фрагменты антител [29, 30, 54]. Нековалентное связывание осуществляется посредством специфического связывания через вспомогательную молекулу, имеющую сродство к альбумину. Непрямая нековалентная связь позволяет терапевтическому белку диссоциировать от молекулы альбумина, что выгодно для облегчения экстравазации и проникновения в ткани [170]. Способность альбумина связываться с эндогенными лигандами была использована при разработке препаратов инсулина (Левемир®, инсулин детемир) и глюкагоноподобного пептида-1 (Виктоза®, лираглутид) с пролонгированным действием. Конъюгация препаратов с жирными кислотами, способными связываться с альбумином крови, увеличила период полувыведения с 4–6 минут до 5–7 часов и от ~2 мин до 11–15 ч, соответственно. Аналогичным образом в качестве вспомогательной молекулы применяются пептиды и белки, специфически с высоким сродством связываемые с сывороточным альбумином. К ним относятся альбумин-связывающие линейные пептидные лиганды [175], альбумин-связывающие домены (ABD) из стрептококкового белка G [68], фрагменты антител (Fab [31, 115, 189], доменные антитела (AlbudAbs) [38], нанотела [118]).

ABD<sub>035</sub>. В качестве исходной молекулы был выбран трехспиральный альбумин-связывающий домен из 46 а.о. с наномолярным сродством к сывороточному альбумину, 14 а.о. из которых были рандомизированы для выявления вариантов с улучшенным сродством и отобраны при помощи фагового дисплея. Вариант ABD<sub>035</sub> показал сродство к человеческому сывороточному альбумину в диапазоне 50–500 фМ, что на несколько порядков выше, по сравнению с доменом дикого типа [70]. В доклинических исследованиях ABD<sub>035</sub> показал улучшенные фармакокинетические свойства фрагментов, различных таргетных рекомбинантно слитых белков, включая растворимые рецепторы [79], цитокины [87], биспецифические одноцепочечные диатела (scDb) [49, 173, 186], пептиды [74, 156], иммунотоксины [86] и, в частности, альтернативных каркасных белков антикалина [91], аффибоди [73, 80, 124, 188], ADAPT [76, 153, 163], DARPin [155, 175].

*Fc-слияние.* Fc-слитые белки содержат Fc-область человеческого IgG1, которая связывается с рецептором FcRn в кислых эндосомах, предотвращающим лизосомальную деградацию молекулы, возвращая их обратно в кровоток и продлевая их период полувыведения из плазмы [209]. Однако, Fc-слитые белки могут не достигать длительного периода полувыведения иммуноглобулинов. Кроме того, эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, способны ограничивать применение технологии. Однако их активность может быть существенно снижена посредством введения мутаций. Примерами клинически одобренных препаратов на основе Fc-слитых рекомбинантных белков являются препараты ингибиторы ФНО $\alpha$  (этанерцепт), VEGF (афлиберцепт), IL-1 (рилонацепт), а CTLA (абатацепт, белатацепт) [129].

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Характеристика и синтез слитых белков аффибоди

Исследуемые слитые белки представляли собой конструкцию на основе HER2-направленной молекулы аффибоди  $Z_{HER2:2891}$  (далее именуемой  $Z_{HER2}$ ), слитой с полипептидным фрагментом для увеличения периода полувыведения ( $ABD_{035}$ ,  $XTEN_{288}$ ,  $XTEN_{576}$ ,  $PAS_{300}$ ,  $PAS_{600}$ ). Домены слитых белков соединялись аминокислотными линкерами, представляющим собой последовательность аминокислот Gly-Gly-Gly-Gly-Ser ( $G_4S$ ),  $(Gly-Gly-Gly-Ser)_3$  ( $G_3S$ ),  $(Ser-Ser-Ser-Gly)_3$  ( $S_3G$ ). Слитые белки конъюгированы с низкомолекулярными цитотоксическими агентами (DM1, MMAE, MMAF). Аминокислотная последовательность His-Glu-His-Glu-His-Glu ( $(HE)_3$ ) была присоединена на N-конец слитых белков для радиомечения технецием-99м. Аминокислотная последовательность Glu-Glu-Glu-Cys ( $E_3C$ ) была присоединена на C-конец слитого белка, цистеин (Cys) которой использовался для сайт-специфического связывания с цитотоксическим агентом. Схематическое изображение общей структуры исследуемых конъюгатов представлено на рисунке 6.

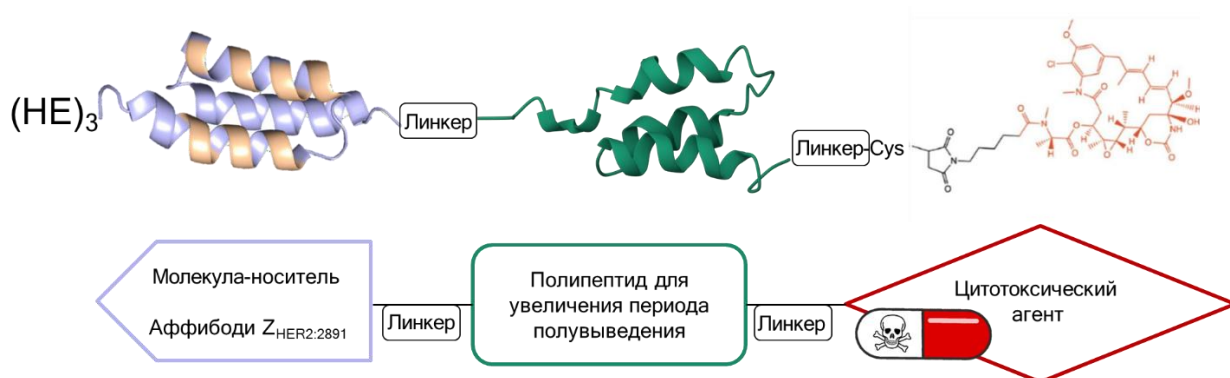


Рисунок 6 – Схематическое изображение общей структуры исследуемых конъюгатов

Были созданы три группы конъюгатов с вариациями структурных компонентов для оценки их влияния на свойства *in vitro* и *in vivo* и выбора оптимальной структуры конъюгата. Для возможности сравнения в исследованиях *in vitro* и *in vivo* каждая группа конъюгатов сравнивалась с созданным и исследованным ранее конъюгатом  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ .

1. Группа конъюгатов с различным составом междоменных линкеров ((G<sub>4</sub>S), (G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>, (S<sub>3</sub>G)<sub>3</sub>):  $Z_{\text{HER2}}\text{-(G}_3\text{S)}_3\text{-ABD-DM1}$ ,  $Z_{\text{HER2}}\text{-(S}_3\text{G)}_3\text{-ABD-DM1}$  в сравнении с  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ . Контрольная конструкция, не содержащая цитотоксического агента,  $Z_{\text{HER2}}\text{-(G}_3\text{S)}_3\text{-ABD-AA}$ , создана для оценки нецелевых цитотоксических свойств *in vitro*.

2. Группа конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения (ABD<sub>035</sub>, XTEN288, XTEN576, PAS300, PAS600):  $Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN288}$ ,  $Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN576}$ ,  $Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS300}$ ,  $Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS600}$  в сравнении с  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ .

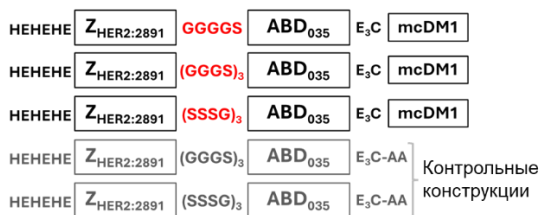
3. Группа конъюгатов с разными цитотоксическими агентами (DM1, MMAE, MMAF):  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAE}$ ,  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$  в сравнении с  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ . Контрольная конструкция с нецелевой молекулой аффибоди,  $Z_{\text{Taq}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$ , создана для оценки нецелевых цитотоксических свойств *in vitro* и *in vivo*.

Схематическое изображение структур исследуемых конъюгатов представлено на рисунке 7.

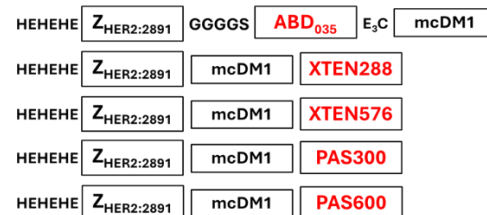
*Конструирование генов, кодирующих слитые белки.* В качестве исходных материалов использовались экспрессионные плазмиды, содержащие гены, кодирующие  $Z_{\text{HER2}:2891}$  – HER2-направленный аффибоди,  $Z_{\text{Taq}}$  – контрольный слитый белок, не связывающийся с белками человеческого происхождения, кроме ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus*, ABD<sub>035</sub> – альбумин-связывающий домен. Экспрессионные плазмиды использовались в качестве матриц для ПЦР-амплификации фрагментов, кодирующих слитые белки  $Z_{\text{HER2}:2891}\text{-ABD}_{035}\text{-Cys}$ ,  $Z_{\text{Taq}}\text{-ABD}_{035}\text{-Cys}$ , содержащих цистеин (Cys) на С-

конце. Во время ПЦР-амплификации домены белков были соединены линкерами с аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser ( $G_4S$ ),  $(Gly-Gly-Gly-Ser)_3$  ( $G_3S$ )<sub>3</sub>,  $(Ser-Ser-Ser-Gly)_3$  ( $S_3G$ )<sub>3</sub> в соответствии с дизайном исследования. Гены, кодирующие  $Z_{HER2:2891}$ -Cys-XTEN288,  $Z_{HER2:2891}$ -Cys-XTEN576,  $Z_{HER2:2891}$ -Cys-PAS300 и  $Z_{HER2:2891}$ -Cys-PAS600, были синтезированы Thermo Fisher Scientific. Последовательность ДНК, кодирующая Met-His-Glu-His-Glu-His-Glu (НЕНЕНЕ), была добавлена к N-концу генов, кодирующих  $Z_{HER2:2891}$  и  $Z_{Taq}$ . Последовательность ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность Glu-Glu-Glu-Cys, была добавлена к C-концу генов слитых белков. Продукты ПЦР очищали с помощью набора для очистки ПЦР Qiagen (Qiagen, Hilden, Германия). Далее продукты ПЦР были соединены с помощью ПЦР с перекрывающимся расширением. Гены были субклонированы в вектор экспрессии pET-26b(+) (Merck Millipore, Берлингтон, Массачусетс, США) с использованием ферментов рестрикции *Nde* I и *Hind* III с последующим лигированием. Последовательности кассет экспрессии были подтверждены секвенированием ДНК.

**1. Группа конъюгатов с различным составом междоменных линкеров:**



**2. Группа конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения:**



**3. Группа конъюгатов с разными цитотоксическими агентами:**

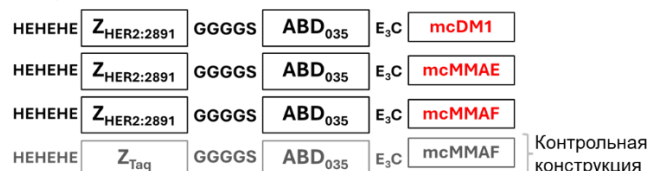


Рисунок 7 – Схематическое изображение структур исследуемых конъюгатов

*Аминокислотная последовательность Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-Cys.*

MHEHEHEAEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSE  
LLSEAKKLND SQAPKGGGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKT  
VEGVEALKLHILAALPEEEEC.

*Аминокислотная последовательность (HE)<sub>3</sub>-Z<sub>HER2</sub>-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>-ABD-E<sub>3</sub>-Cys.*

MHEHEHEAEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSE  
LLSEAKKLND SQAPKGGGSGGGSGGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYK  
RLINKAKTVEGVEALKLHILAALPEEEEC.

*Аминокислотная последовательность (HE)<sub>3</sub>-Z<sub>HER2</sub>-(S<sub>3</sub>G)<sub>3</sub>-ABD-E<sub>3</sub>-Cys.*

MHEHEHEAEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSE  
LLSEAKKLND SQAPKSSSGSSSGSSGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRL  
INKAKTVEGVEALKLHILAALPEEEEC.

*Аминокислотная последовательность (HE)<sub>3</sub>-Z<sub>HER2</sub>-Cys-PAS300.*

MHEHEHEAEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSE  
LLSEAKKLND SQAPKCASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPA  
PSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPA  
PASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAP  
AASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASP  
AAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASP  
AAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPA  
PSAPA.

*Аминокислотная последовательность (HE)<sub>3</sub>-Z<sub>HER2</sub>-Cys-PAS600.*

MHEHEHEAEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSE  
LLSEAKKLND SQAPKCASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPA  
PSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPA  
PASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAP  
AASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASP  
AAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASP  
AAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPA

PSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPA  
 PASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAP  
 AASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASP  
 AAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASP  
 AAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPA  
 PSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPA

*Аминокислотная последовательность (HE)<sub>3</sub>-Z<sub>HER2</sub>-Cys-XTEN288.*

MHEHEHEAEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSE  
 LLSEAKKLNDSQAPKCGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP  
 GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA  
 TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE  
 GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT  
 SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP  
 GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP.

*Аминокислотная последовательность (HE)<sub>3</sub>-Z<sub>HER2</sub>-Cys-XTEN576.*

MHEHEHEAEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSE  
 LLSEAKKLNDSQAPKCGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP  
 GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT  
 SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP  
 GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA  
 TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP  
 GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA  
 TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP  
 GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS  
 PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP  
 GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS  
 PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP.

*Экспрессия и очистка слитых белков.* Конструкции слитых белков были экспрессированы в культурах *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) (New England

Biolabs) во встряхиваемых колбах объемом 500 мл при температуре 37 °С в триптическом соевом бульоне, содержащем 100 мкг/мл ампициллина. Экспрессия белка была индуцирована при значениях OD<sub>600</sub> от 0,6 до 1 добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (Appolo Scientific, Стокпорт, Великобритания) до конечной концентрации 1 мМ. Продукция слитых белков проводилась в течение 3 часов, после чего клетки собирали центрифугированием и лизировали ультразвуком. Клеточный дебрис был осажден центрифугированием, а супернатанты были подвергнуты термической обработке при 95 °С в течение 10 минут для осаждения слитых белков *E. coli*. После охлаждения супернатанты были очищены центрифугированием с последующей фильтрацией через шприцевой фильтр Acrodisc 0,45 мкм (Pall, Порт-Вашингтон, Нью-Йорк, США). Супернатанты очищали с помощью анионообменной хроматографии (Q-Sepharose FF 8 мл; GE healthcare, Uppsala, Sweden) с последующей обращенно-фазовой хроматографией (Source RPC 3 мл, GE Healthcare) с использованием хроматографической системы ÄКТА (GE Healthcare). Фракции, содержащие конструкции аффибоди, объединяли и лиофилизировали. Затем конструкции аффибоди растворяли в фосфатно-буферном растворе (PBS, Phosphate Buffered Saline, pH 7,4) с добавлением 10 мМ раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

## 2.2 Конъюгация слитых белков аффибоди с цитотоксическим агентом

Лиофилизированные белки повторно растворяли в PBS (pH 6,5) до концентрации 0,1 мМ. Далее белки инкубировали с 5 мМ трис(2-карбоксиитил)фосфин гидрохлоридом (ТСЕР) в течение 1 часа при 37 °С для восстановления окисленных С-концевых цистеинов на конструкциях слитых белков, которые потенциально могли окислиться во время производства и

очистки белка. Для удаления избытка TCEP белки пропускали через эксклюзионные картриджи PD-10 (GE Healthcare) с последующим концентрированием до 0,1 мМ с помощью центрифужного концентратора. Препараты цитотоксических агентов с малеимидакапроиловыми (mc) линкерами, mcDM1, mcMMAF, mcMMAE (Levena Biopharma, Сан-Диего, Калифорния, США), растворяли в ДМСО до итоговой концентрации 20 мМ. Каждый препарат в виде свежеприготовленного раствора добавлялся к раствору, содержащему Z<sub>HER2</sub>-ABD в молярном соотношении 3:1 (препарат цитотоксического агента: белок), с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 1 ч. Для слитых белков, содержащих Z<sub>HER2</sub>-Cys-XTEN288, Z<sub>HER2</sub>-Cys-XTEN576, Z<sub>HER2</sub>-Cys-PAS300 и Z<sub>HER2</sub>-Cys-PAS600, был использован свежеприготовленный раствор mcDM1 (20 мМ) в молярном соотношении 2:1 (mcDM1: белок) с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение ночи. Нетоксичные контрольные конструкции были получены путем алкилирования С-концевых цистеинов Z<sub>HER2</sub>-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>-ABD-E<sub>3</sub>-Cys и Z<sub>HER2</sub>-(S<sub>3</sub>G)<sub>3</sub>-ABD-E<sub>3</sub>-Cys с помощью 2-йодацетамида (ИАА). Лиофилизированные Z<sub>HER2</sub>-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>-ABD-E<sub>3</sub>-Cys и Z<sub>HER2</sub>-(S<sub>3</sub>G)<sub>3</sub>-ABD-E<sub>3</sub>-Cys растворяли в алкилирующем буфере (0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,0), потенциально окисленные остатки цистеина восстанавливали с помощью TCEP, как указано выше. Далее добавляли 2-йодацетамид до конечной концентрации 10 мМ, после чего инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте для алкилирования цистеинов. Далее белки очищали с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка Zorbax C18 SB (Agilent, Санта-Клара), буфер А – 0,1 % трифторуксусная кислота (ТФА) в воде, буфер В – 0,1 % ТФА в ацетонитриле, скорость потока 3 мл/мин). Элюированные фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и лиофилизировали, восстанавливали в PBS (pH 7,4) и хранили при температуре -20 °С до использования.

### **2.3 Методы оценки качества таргетных терапевтических конъюгатов на основе аффибоди**

Полученные конъюгаты анализировали с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), где разделение происходило в восстанавливающих условиях на геле NuPAGE Bis-Tris (12 %, Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Каждый исследуемый конъюгат (10 мкг) смешивали с буфером в присутствии додецилсульфата натрия и инкубировали при 95°C в течение 10 мин. Далее образцы загружали в лунки геля NuPAGE Bis-Tris. Электрофоретическое разделение проводили при 200 В в течение 1 часа при 4 °С. Гель окрашивали красителем GelCode blue (Thermo Fisher Scientific, Финляндия) в течение 1 часа и отмывали в воде.

Конъюгаты также подвергали аналитической эксклюзионной хроматографии. Каждый образец (5 мкг) загружали в колонку Superdex-75 5/150 (GE Healthcare). В качестве рабочего буфера использовали PBS, скорость потока составляла 0,45 мл/мин. Очищенные конъюгаты анализировали с помощью масс-спектрометрии ESI-TOF (Agilent). Далее конъюгаты анализировали при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ (Zorbax C18 SB, Agilent) с использованием 30-минутного градиента от 30 % до 60 % буфера В (0,1 % ТФА в ацетонитриле) при скорости потока 1 мл/мин. Чистоту определяли путем расчета площади под кривой всех пиков в записанных хроматограммах.

## 2.4 Методики радиомечения таргетных терапевтических конъюгатов на основе аффибоди

Для возможности проведения доклинических исследований *in vitro* и *in vivo* проводилось сайт-специфическое мечение исследуемых конъюгатов трикарбонильным технецием-99m  $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ . Сайт-специфическое мечение через аминокислотную последовательность (HE)<sub>3</sub> (His-Glu-His-Glu-His-Glu) на N-конце конъюгатов обеспечивает остаточную метку, позволяющую отслеживать поглощение и катаболизм конъюгатов, оказывая при этом минимальное влияние на их свойства [85].

*Методика приготовления прекурсора трикарбонильного технеция-99m.* Для приготовления прекурсора  $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  был использован коммерческий набор «CRS Isolink kit» (Center for Radiopharmaceutical Science, Виллиген, Швейцария), содержащий 2,9 мг натрия тетрабората декагидрата, 7,8 мг натрия карбоната, 9,0 мг калия натрия тартрата тетрагидрата и 4,5 мг динатрия боранокарбоната, в соответствии с инструкцией производителя. Для этой цели пертехнетат технеция-99m  $[[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ , полученный из генератора <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc (Mallinckrodt, Petten, Нидерланды) элюированием стерильным раствором 0,9 % натрия хлорида, добавляли во флакон набора «CRS Isolink» в объеме 500 мкл (3,2–4,7 ГБк). Реакционную смесь перемешивали и инкубировали при температуре 100 °С в течение 30 минут.

### Методика радиосинтеза группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров

*Методика радиосинтеза  $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-(\text{G}_3\text{S})_3\text{-ABD-DM1}$ .* Раствор прекурсора трикарбонильного технеция-99m  $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1, далее 22 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 29 мкл конъюгата (HE)<sub>3</sub>-

$Z_{HER2}-(G_3S)_3-ABD-E_3-DM1$  (40 мкг, 1,37 мг/мл) и инкубировали при температуре 60 °С в течение 60 минут.

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-(S_3G)_3-ABD-DM1$ .* Раствор прекурсора трикарбонильного технеция-99m  $[[^{99m}Tc]Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$  нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1, далее 19-26 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 31 мкл конъюгата  $(HE)_3-Z_{HER2}-(S_3G)_3-ABD-E_3-DM1$  (40 мкг, 1,28 мг/мл) и инкубировали при температуре 60 °С в течение 60 минут.

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-G_4S-ABD-DM1$ .* Раствор прекурсора трикарбонильного технеция-99m  $[[^{99m}Tc]Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$  нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1, далее 19-26 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 37 мкл конъюгата  $(HE)_3-Z_{HER2}-G_4S-ABD-E_3-DM1$  (40 мкг, 1,07 мг/мл) и инкубировали при температуре 60 °С в течение 60 минут.

#### **Радиомечение группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами**

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-G_4S-ABD-DM1$ .* Как указано выше.

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-G_4S-ABD-MMAF$ .* Раствор прекурсора трикарбонильного технеция-99m  $[[^{99m}Tc]Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$  нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1, далее 19-26 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 23 мкл конъюгата  $(HE)_3-Z_{HER2}-G_4S-ABD-E_3-DM1$  (40 мкг, 1,72 мг/мл) и инкубировали при температуре 60 °С в течение 60 минут.

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-G_4S-ABD-MMAE$ .* Раствор прекурсора трикарбонильного технеция-99m  $[[^{99m}Tc]Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$  нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1, далее 19-26 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 38 мкл конъюгата  $(HE)_3-$

$Z_{HER2}$ -G<sub>4</sub>S-ABD-E<sub>3</sub>-DM1 (40 мкг, 1,06 мг/мл) и инкубировали при температуре 60 °С в течение 60 минут.

**Радиомечение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения**

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}$ -G<sub>4</sub>S-ABD-DM1.* Как указано выше.

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}$ -DM1-XTEN288.* Раствор прекурсора трикарбонильного технеция-99m  $[[^{99m}Tc]Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$  нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1, далее 19-26 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 38 мкл конъюгата (HE)<sub>3</sub>- $Z_{HER2}$ -Cys/mcDM1-XTEN288 (30 мкг, 1,36 мг/мл) и 91 мкл PBS и инкубировали при температуре 60 °С в течение 60 минут.

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}$ -DM1-XTEN576.* Раствор прекурсора трикарбонильного технеция-99m  $[[^{99m}Tc]Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$  нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1, далее 19-26 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 30 мкл конъюгата (HE)<sub>3</sub>- $Z_{HER2}$ -Cys/mcDM1-XTEN576 (30 мкг, 1,99 мг/мл) и 83 мкл PBS и инкубировали при температуре 60 °С в течение 60 минут.

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}$ -DM1-PAS300.* Раствор прекурсора трикарбонильного технеция-99m  $[[^{99m}Tc]Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$  нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1, далее 19-26 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 38 мкл конъюгата (HE)<sub>3</sub>- $Z_{HER2}$ -DM1-PAS300 (60 мкг, 0,79 мг/мл) и 75 мкл PBS и инкубировали при температуре 60 °С в течение 60 минут.

*Методика радиосинтеза  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}$ -DM1-PAS600.* Раствор прекурсора трикарбонильного технеция-99m  $[[^{99m}Tc]Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$  нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1, далее 19-26 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 113 мкл конъюгата

(HE)<sub>3</sub>-Z<sub>HER2</sub>-Cys/DM1-PAS600 (60 мкг, 0,53 мг/мл) и 64 мкл PBS и инкубировали при температуре 60 °С в течение 60 минут.

После окончания инкубации определяли радиохимический выход (РХВ) меченных соединений методом тонкослойной радиохроматографии (радио-ТСХ). Далее <sup>99m</sup>Tc-меченные конъюгаты очищали гель-эксклюзионной хроматографией с использованием заполненных сефадексом картриджей NAP-5 (Sephadex G-25, GE Healthcare, Великобритания), предварительно уравновешенных и элюированных 10 мл PBS (рН 7,4).

РХВ и радиохимическую чистоту (РХЧ) меченных соединений определяли с использованием ТСХ-пластинок с силикагелем (Varian, Лейк-Форест, Калифорния, США) в качестве неподвижной фазы и PBS в качестве подвижной фазы. В этой системе анализируемый <sup>99m</sup>Tc-меченный конъюгат и коллоид восстановленного гидролизованного <sup>99m</sup>Tc, [<sup>99m</sup>Tc]TcO<sub>2</sub>, оставались в точке нанесения ( $R_f = 0$ ), в то время как ионы несвязанного <sup>99m</sup>Tc, [<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> и [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, мигрировали с фронтом растворителя ( $R_f = 1$ ).

Для определения присутствия коллоида восстановленного гидролизованного <sup>99m</sup>Tc ТСХ-пластинки элюировали в системе пиридин : уксусная кислота : вода (10 : 3 : 1,5). В этой системе коллоид [<sup>99m</sup>Tc]TcO<sub>2</sub> оставался в точке нанесения ( $R_f = 0$ ), в то время как <sup>99m</sup>Tc-меченный анализируемый конъюгат, [<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> мигрировали с фронтом растворителя ( $R_f = 1$ ).

Стабильность радиомеченных комплексов оценивали путем инкубации очищенных конъюгатов с 1000-кратным молярным избытком гистидина в PBS или только с PBS для контрольных образцов в течение 4 ч при 37 °С.

## 2.5 Характеристика биологических объектов исследования

### 2.5.1 Клеточные линии и условия культивирования

В качестве экспериментальных моделей для проведения исследований *in vitro* использовались HER2-позитивные клеточные линии SKOV3 (аденокарцинома яичников), SKBR3 (аденокарцинома молочной железы), AU565 (аденокарцинома молочной железы), BT474 (протоковая карцинома молочной железы) и клеточные линии с низкой экспрессией HER2 – A549 (аденокарцинома легкого) и MCF7 (аденокарцинома молочной железы). Все клеточные линии приобретены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, LGC Promochem, Борос, Швеция). Клеточные линии SKOV3, SKBR3, AU565, BT474 культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Biowest); Клеточные линии A549 и MCF7 культивировали в модифицированной среде Игла Дульбекко/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biowest). Все используемые среды содержали 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS, Sigma-Aldrich), за исключением среды для клеток BT474, содержащей 20 % FBS (Sigma-Aldrich), 2 мМ L-глутамин и раствора пенициллина-стрептомицина (Biowest). Клетки выращивали при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.5.2 Экспериментальные животные

Эксперименты по оценке биораспределения проводились на здоровых мышах – самках стока CD-1 и линии NMRI. Оценка биораспределения таргетных конъюгатов, изучение их таргетных свойств и экспериментальная терапия *in vivo* проводились в иммунодефицитных мышах BALB/c nu/nu с

привитыми HER2-экспрессирующими ксенографтами клеточной линии SKOV3 (аденокарцинома яичников). Мыши линии BALB/c nu/nu проявляют недостаточность клеточно-опосредованного иммунитета, что позволяло использовать их в качестве биологической модели для выращивания злокачественных опухолей путем имплантации перевиваемой культуры опухолевых клеток.

Содержание, манипуляции и эксперименты с животными проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных и были одобрены требованиями этического разрешения комитета по исследованиям животных Уппсальского университета (разрешение 5.8.18–11931/2020 от 28.08.2020); в соответствии с приказом МЗ РФ от 1 августа 2016 N 199н и были одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол IACUC №1 от 27.09.2022).

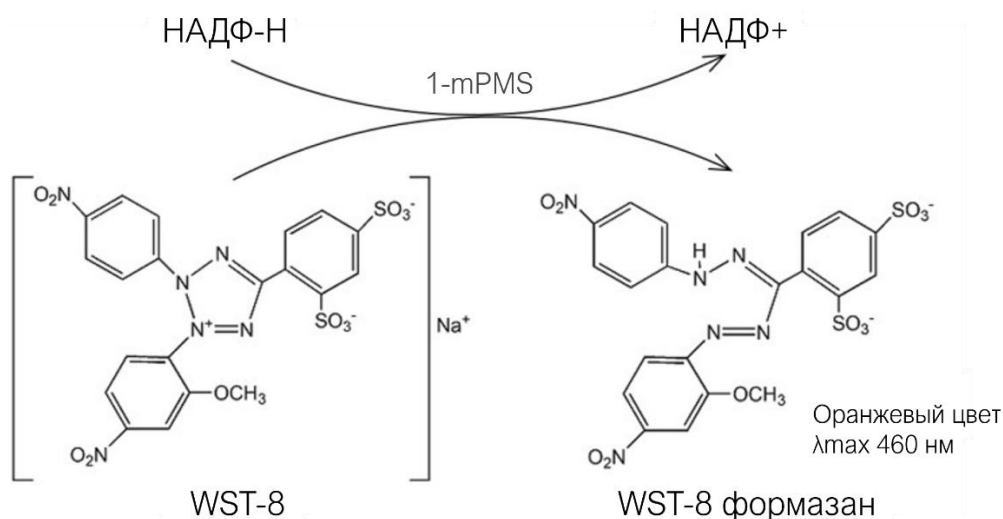
## **2.6 Изучение функциональной пригодности таргетных терапевтических конъюгатов в исследованиях *in vitro***

Выполнение исследований *in vitro* осуществлялось на базе лаборатории иммунологии, генетики и патологии Уппсальского университета (Швеция) под руководством профессора В.М.Толмачева.

### **2.6.1 Оценка цитотоксичности и определение IC50 методом WST-8-теста**

WSTs (Water-Soluble Tetrazolium salts, водорастворимые тетразолиевые соли) — группа водорастворимых тетразолиевых красителей второго поколения, широко используемых в колориметрических тестах для оценки

метаболической активности клеток. Краситель WST-8 (2-(2-метокси-4-нитропентил)-3-(4-нитропентил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2Н-тетразолиум) восстанавливается НАДФ-Н-зависимыми клеточными оксидоредуктазами с образованием продукта формазана, оранжевого красителя с максимальным поглощением при длине волны 450 нм. Количество восстановленного WST-8-формазана пропорционально концентрации НАДФ-Н и, соответственно, количеству жизнеспособных клеток. WST-8 имеет отрицательный заряд и не проникает в клетки. Восстановление осуществляется вне клетки посредством переноса электронов через плазматическую мембрану в присутствии промежуточного акцептора электронов – 1-метоксифеназин метосульфата (1-mPMS, рисунок 8). Преимуществами метода WST-8 являются высокая чувствительность метода и эффективный сигнал; низкая токсичность для клеток благодаря внеклеточному восстановлению красителя WST-8 и отсутствию токсичных растворителей, что также позволяет проводить длительные инкубации без риска появления артефактов; одностадийность метода.



НАДФ-Н – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный, НАДФ+ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, 1-mPMS – 1-метоксифеназин метосульфат, WST-8 – водорастворимая тетразолиевая соль

Рисунок 8 – Схематическое изображение реакции для определения активности дегидрогеназы с использованием колориметрического анализа WST-8. Адаптировано из [40]

Эксперименты проводили на клеточных линиях с высокой экспрессией HER2: SKOV-3, SKBR3, AU565 и BT474 и клеточной линии A549 и MCF7 с низкой экспрессией HER2. За сутки до эксперимента каждую клеточную линию высевали в 96-луночный планшет в количестве  $5 \times 10^3$  клеток в объеме 100 мкл суспензии на лунку ( $2 \times 10^3$  клеток в объеме 100 мкл суспензии на лунку для SKOV3) и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. В день эксперимента надклеточную среду удаляли, в лунки добавляли 100 мкл среды, содержащих серийные разведения концентраций немеченных конъюгатов с последующей инкубацией в течение 72 часов при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. В качестве положительного контроля использовали культуры клеток без добавления исследуемых конъюгатов. После инкубации жизнеспособность клеток определяли с использованием реактива WST-8 (Water-Soluble Tetrazolium 8) в составе коммерческого набора для определения цитотоксичности и контроля пролиферации клеток ССК-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) посредством добавления в каждую лунку 10 мкл раствора реактива ССК-8 с последующей инкубацией в течение 3 часов при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> (в соответствии с протоколом, представленным производителем). Эксперименты выполнялись в четырехкратном повторении. Измерение оптического поглощения содержимого каждой лунки проводили на планшетном спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Финляндия) при длинах волн 450 нм (рабочая) и 650 нм (сравнения). Процент жизнеспособных клеток в каждой лунке рассчитывали относительно лунок контроля, жизнеспособность которых принимали за 100 %. Для каждой концентрации исследуемых конъюгатов было рассчитано стандартное отклонение. Для численного выражения цитотоксичности конъюгатов определяли концентрацию полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) – концентрацию конъюгата в растворе, при которой количественный показатель восстановления WST-8 до формазана составлял 50 % для необработанных клеток в отрицательном контроле. Построение кривых зависимости

жизнеспособности клеток в зависимости от концентрации исследуемых конъюгатов и расчет  $IC_{50}$  методом нелинейной регрессии проводили с использованием программы Prism (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

### 2.6.2 Оценка специфичности связывания

За сутки до эксперимента клетки SKOV3, BT474 и SKBR3 высевали в 6-луночные планшеты в количестве  $8 \times 10^5$  клеток в 2 мл среды на лунку и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С, 5 %  $CO_2$ . В день эксперимента приготавливались растворы: блокирующие растворы, содержащие немеченные радиоактивным изотопом конъюгаты, для предварительного блокирования рецепторов HER2 на клетках; и радиоактивные растворы  $^{99m}Tc$ -меченных исследуемых конъюгатов. В день эксперимента в культуральных планшетах удаляли надклеточную среду, затем для насыщения рецепторов HER2 в один набор чашек ( $n=3$ ) каждой клеточной линии добавляли немеченные конъюгаты с концентрацией 1000 нМ в объеме 500 мкл, в то время как в другой набор чашек ( $n=3$ ) добавляли равный объем культуральной среды. Далее оба набора чашек инкубировали при температуре 37°С в течение 30 минут. После инкубации в каждый набор чашек добавляли 500 мкл  $^{99m}Tc$ -меченных конъюгатов (итоговая концентрация 2 нМ) и инкубировали при 37°С в течение 60 минут. После инкубации надклеточную среду собирали в пробирки для гамма-спектрометра, клетки промывали раствором PBS и собирали в эти же пробирки для гамма-спектрометра. Далее клетки лизировали путем инкубации с 1 М NaOH при 37°С в течение 15–30 минут с последующим сбором клеточного дебриса посредством клеточного скребка, клеточный дебрис помещали в пробирки для гамма-спектрометра, чашки промывали 1 М NaOH и собирали в эти же пробирки для гамма-спектрометра. Активность собранных фракций (надклеточной среды, содержащей не

связанные с клетками конъюгаты, и клеточных лизатов) измеряли с помощью автоматического гамма-спектрометра с NaI (TI) детектором (2480 Wizard, Финляндия) и рассчитывали процент клеточно-ассоциированной активности по формуле 1.

$$A_{\text{клеточно-ассоциированная, \%}} = A_{\text{к.ф.}} / (A_{\text{к.ф.}} + A_{\text{н.с.}}) \times 100 \% (1),$$

где  $A_{\text{к.ф.}}$  – активность клеточной фракции, СРМ,

$A_{\text{н.с.}}$  – активность надклеточной среды, СРМ.

### 2.6.3 Измерение аффинности связывания

Для измерения аффинности и кинетики связывания исследуемых конъюгатов с HER2-экспрессирующими клетками SKOV3 в режиме реального времени использовали LigandTracer Yellow (Ridgeview Instruments, Vänge, Швеция). Метод LigandTracer основан на регистрации детектором радиоактивного сигнала от комплекса «лиганд-рецептор». Сигнал представляет собой разницу сигнала активной области чашки Петри (область с живыми, экспрессирующими мишень, клетками) и контрольной области (без целевых клеток) после добавления исследуемого радиоактивно меченного лиганда (рисунок 9). Измерение дифференциального сигнала при возрастающих концентрациях лиганда позволяет определить сродство лиганда к мишени (равновесные константы диссоциации) и получить кривую уровня связывания в зависимости от концентрации лиганда [50].

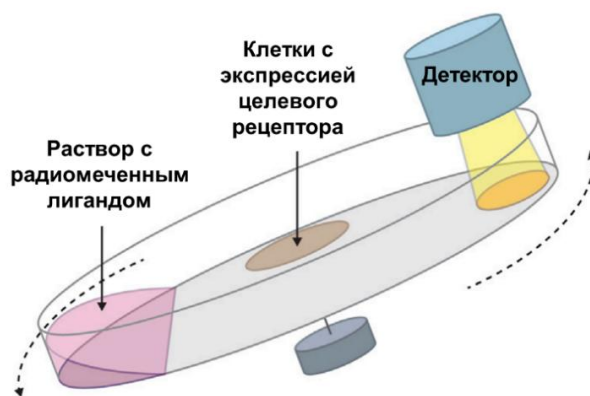


Рисунок 9 – Устройство и принцип работы LigandTracer.

Адаптировано из [164]

Для каждого измерения за сутки до эксперимента на локальную область чашки Петри высевали клетки SKOV3 в количестве  $2 \times 10^6$  клеток, область чашки Петри без клеток использовалась в качестве контрольной. В день эксперимента, после замены культуральной среды чашку Петри помещали на наклонную подложку прибора с медленным вращением. В каждую чашку добавляли возрастающие концентрации (1, 2 и 5 нМ) соответствующего  $^{99m}\text{Tc}$ -меченного конъюгата с последующим измерением клеточно-ассоциированной активности и активности контрольной области чашки. Каждая концентрация добавлялась после установления равновесия скоростей ассоциации и диссоциации комплекса «лиганд-рецептор» и выхода сигнала детектора на плато. После добавления последней концентрации и установления равновесия «лиганд-рецептор» среду, содержащую исследуемый конъюгат, заменяли средой без конъюгата и регистрировали фазу диссоциации в течение ночи. В полученные данные вносили поправку на распад  $^{99m}\text{Tc}$ . Анализ данных и определение равновесных констант диссоциации (значений  $K_d$ ) производили с помощью программы TraceDrawer (Ridgeview Instruments).

## 2.6.4 Оценка интернализации

После связывания молекулы-лиганда с целевым рецептором на поверхности мембраны происходит интернализация комплекса «рецептор-лиганд» внутрь клетки, транспорт в ранние и поздние эндосомы и лизосомы для деградации с последующим высвобождением катаболитов из клетки (рисунок 10). Анализ интернализации *in vitro* позволяет оценить скорость проникновения молекулы внутрь опухолевой клетки, а также скорость высвобождения радиокатаболитов.

Для изучения интернализации исследуемых конъюгатов проводилась оценка трех фракций: надклеточной среды, содержащей не связанные с клетками конъюгаты; мембранно-связанной фракции; фракции интернализированных конъюгатов. Для разделения последних двух фракций использовался метод «кислотной промывки», при котором связанная с мембраной фракция радиоактивно меченого агента удаляется в кислых условиях, а оставшаяся связанная с клетками фракция считается интернализированной [206].

За 1 сутки до эксперимента клетки SKOV3 и BT474 засеивали в чашки Петри в количестве в  $8 \times 10^5$  клеток в объёме 2 мл среды на каждую чашку. В день эксперимента надклеточную среду удаляли, в чашки добавляли 1 мл  $^{99m}\text{Tc}$ -меченных исследуемых конъюгатов в концентрации 2 нМ с последующей инкубацией при  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . Чашки подвергались анализу после инкубации через 1, 2, 4, 6 и 24 часа, в количестве 3 чашки Петри на каждую временную точку. Для этой цели в выбранные точки времени собирали надклеточную среду, клетки промывали ледяным PBS. Для сбора мембранно-связанной активности клетки инкубировали с 0,2 М глициновым буфером, содержащим 4 М мочевины (рН 2,0), в течение 5 минут на льду. Раствор собирали, клетки промывали тем же буфером и собирали в пробирки

для гамма-спектрометра. Для сбора интернализированной фракции клетки лизировали 1 М NaOH в течение 15–30 минут при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>. Затем клеточный дебрис собирали с использованием клеточного скребка в пробирки для гамма-спектрометра, чашки промывали раствором PBS, растворы объединяли. Активность фракций измеряли с использованием автоматического гамма-спектрометра с NaI (Тl) детектором (2480 Wizard, Финляндия) и рассчитывали процент клеточно-ассоциированной активности для каждой фракции по формуле 1.

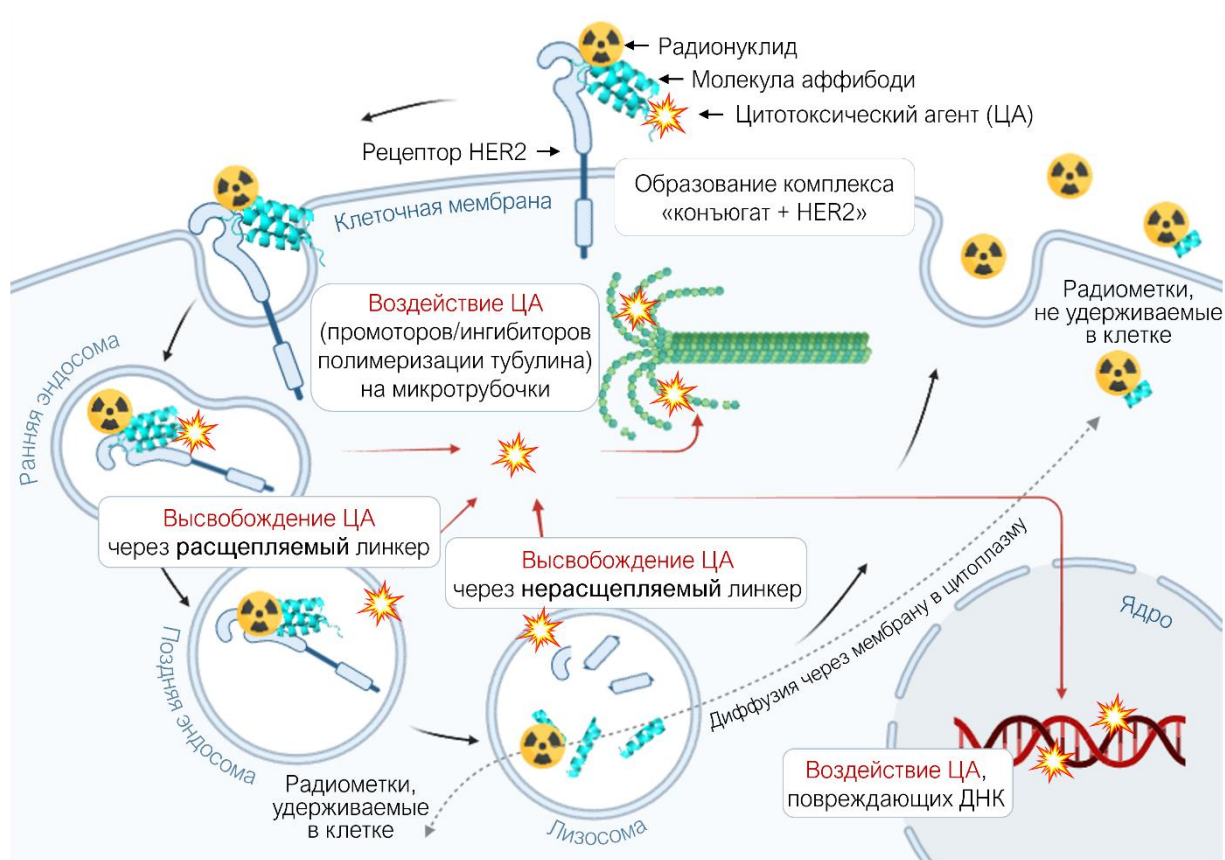


Рисунок 10 – Схематическое представление процесса интернализации радиомеченного терапевтического конъюгата на основе аффибоды

## 2.7 Изучение функциональной пригодности, биораспределения и фармакокинетики таргетных терапевтических конъюгатов *in vivo*

Выполнение исследований *in vivo* осуществлялось на базе лаборатории иммунологии, генетики и патологии Уппсальского университета (Швеция) и научно-исследовательского центра «Онкотераностика» исследовательской школы химических и биомедицинских технологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет».

### 2.7.1 Изучение группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров на здоровых мышцах линии NMRI

Для изучения биораспределения и фармакокинетических свойств группы конъюгатов с разными междоменными линкерами 36 самок мышей линии NMRI были рандомизированы в 9 групп, по 4 мыши в каждой. Затем каждый  $^{99m}\text{Tc}$ -меченный исследуемый конъюгат группы ( $^{99m}\text{Tc}$ )-Z<sub>HER2</sub>-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>-ABD-DM1, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-Z<sub>HER2</sub>-(S<sub>3</sub>G)<sub>3</sub>-ABD-DM1, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1) внутривенно вводили в хвостовую вену в дозе 6 мкг (400 пмоль) вещества на мышшь для последующей оценки биораспределения через 4, 24 и 48 ч после инъекции. Введенная активность исследуемых конъюгатов составила 60 кБк для временной точки 4 ч, 640 кБк – для 24 ч и 10,2 МБк – для 48 ч. Перед проведением исследования животных взвешивали, средняя масса тела животных составила  $28,3 \pm 2,6$  г. Через обозначенные промежутки времени после инъекции мышшь анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции кетамин-ксилазинового раствора (кетамин 10 мг/мл, ксилазин 1

мг/мл; 30 мкл раствора на грамм массы тела) и умерщвляли путем пункции сердца. Кровь собирали гепаринизированным шприцем, животных препарировали, органы и ткани, необходимые для исследования, собирали и взвешивали, активность измеряли с помощью автоматического гамма-счетчика с NaI (Тl) детектором (2480 Wizard, Финляндия). Поглощение активности рассчитывали как процент введенной дозы на грамм образца (% ВД/г).

### **2.7.2 Изучение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, на здоровых мышах стока CD-1**

Для изучения биораспределения и фармакокинетических свойств группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, 60 самок мышей стока CD-1 были рандомизированы на 15 групп по 4 мыши в каждой. Затем каждый  $^{99m}\text{Tc}$ -меченный исследуемый конъюгат группы внутривенно вводили в хвостовую вену в дозе 200 пмоль вещества на мышь в объеме 100 мкл PBS, содержащего 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) (7 мкг для [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-XTEN288-DM1 и [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-PAS300-DM1; 12,5 мкг для [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-XTEN576-DM1 и [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-PAS600-DM1; 3 мкг для [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1) для последующей оценки биораспределения через 4, 24 и 48 ч после инъекции. Введенная активность исследуемых конъюгатов составила 60 кБк для временной точки 4 ч, 640 кБк – для 24 ч и 10,2 МБк – для 48 ч. Перед проведением исследования животных взвешивали, средняя масса тела животных составила  $29,6 \pm 3,5$  г. Через обозначенные промежутки времени после инъекции мышей анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции кетамин-ксилазинового раствора (кетамин 10 мг/мл, ксилазин 1 мг/мл; 30 мкл

раствора на грамм массы тела) и умерщвляли путем цервикальной дислокации (смещением шейных позвонков). Кровь собирали гепаринизированным шприцем, животных препарировали, органы и ткани, необходимые для исследования, собирали и взвешивали, активность измеряли с помощью автоматического гамма-счетчика с NaI (TI) детектором (2480 Wizard, Финляндия). Поглощение активности в органах и тканях рассчитывали как процент введенной дозы вещества на грамм образца (% ВД/г). Удержание активности в крови (% ВД/г) анализировалось с помощью Prism (программное обеспечение Graphpad, Ла-Хойя, Калифорния, США) для расчета периодов полувыведения.

### **2.7.3 Изучение на моделях опухолевого роста группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения**

Для имплантации опухолей HER2-позитивная клеточная линия SKOV3 ( $1 \times 10^7$  клеток в 100 мкл среды) и HER2-негативная клеточная линия Ramos (человеческая клеточная линия лимфомы Биркитта,  $5 \times 10^6$  клеток в 100 мкл среды) были подкожно введены в заднюю ногу самок мышей BALB/c nu/nu. Исследования проводили через две недели после имплантации опухоли. Мышей рандомизировали на девять групп по четыре мыши в каждой. Средняя масса тела мышей составила  $18,4 \pm 1,2$  г, средняя масса опухоли SKOV3 составила  $0,33 \pm 0,14$  г, средняя масса опухоли Ramos составила  $0,56 \pm 0,24$  г. Каждый исследуемый конъюгат внутривенно вводили в хвостовую вену в дозе 200 пмоль вещества на мышшь в объеме 100 мкл PBS, содержащего 1 % БСА (7 мкг для [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-XTEN288-DM1 и [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-PAS300-DM1; 12,5 мкг для [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-XTEN576-DM1 и [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-PAS600-DM1; 3 мкг для [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1) для последующей оценки

биораспределения через 4, 24 и 48 ч после инъекции. Введенная активность исследуемых конъюгатов составила 60 кБк для временной точки 4 ч, 640 кБк – для 24 ч и 10,2 МБк – для 48 ч. Через обозначенные промежутки времени после инъекции мышей анестезировали путем внутривенной инъекции кетамин-ксилазинового раствора (кетамин 10 мг/мл, ксилазин 1 мг/мл; 30 мкл раствора на грамм массы тела) и умерщвляли путем пункции сердца. Кровь собирали гепаринизированным шприцем, животных препарировали, органы и ткани, необходимые для исследования, собирали и взвешивали, активность измеряли с помощью автоматического гамма-счетчика с NaI (Тl) детектором (2480 Wizard, Финляндия). Поглощение активности в органах и тканях рассчитывали как процент введенной дозы вещества на грамм образца (% ВД/г).

#### **2.7.4 Изучение на моделях опухолевого роста группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами**

Для имплантации опухоли 36 самкам мышей линии BALB/c nu/nu в заднюю ногу были подкожно введены  $10^7$  HER2-экспрессирующих клеток SKOV3 в объеме 100 мкл среды. Эксперимент по оценке биораспределения проводили через 3 недели после имплантации опухоли. В день эксперимента мышей рандомизировали на 9 групп: по 4 мыши в каждой группе. Затем каждый  $^{99m}\text{Tc}$ -меченный исследуемый конъюгат группы ( $^{99m}\text{Tc}$ ]-Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1,  $^{99m}\text{Tc}$ ]-Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF,  $^{99m}\text{Tc}$ ]-Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAE) внутривенно вводили в хвостовую вену в дозе 6 мкг (400 пмоль) вещества на мышь для последующей оценки через 4, 24 и 48 ч после инъекции. Введенная активность исследуемых конъюгатов составила 60 кБк для временной точки 4 ч, 640 кБк – для 24 ч и 10,2 МБк – для 48 ч. Животных взвешивали, средняя масса тела животных составила  $19,3 \pm 1,1$  г. Через

обозначенные промежутки времени после инъекции мышей анестезировали путем внутривенной инъекции кетамин-ксилазинового раствора (кетамин 10 мг/мл, ксилазин 1 мг/мл; 30 мкл раствора на грамм массы тела) и умерщвляли путем пункции сердца. Кровь собирали гепаринизированным шприцем, животных препарировали, органы и ткани, необходимые для исследования, собирали и взвешивали, активность измеряли с помощью автоматического гамма-счетчика с NaI (TI) детектором (2480 Wizard, Финляндия). Поглощение активности рассчитывали как процент введенной дозы на грамм образца (% ВД/г).

## **2.8 Проведение экспериментальной терапии *in vivo* для оценки противоопухолевого эффекта группы конъюгатов с различными цитотоксическими агентами**

Для проведения экспериментального терапевтического исследования 37 самкам мышей линии BALB/c nu/nu имплантировали подкожно в область живота  $10^7$  клеток SKOV3 (аденокарцинома яичников) в 100 мкл среды. Через неделю после имплантации мышей рандомизировали в четыре группы (А, Б, В, Г) по 8–10 мышей в каждой группе, принимая за основной критерий показатель массы тела с условием, что отклонение единичных показателей массы от среднего значения не превышает 10 %. Далее мышам в хвостовую вену вводили инъекции исследуемых конъюгатов  $Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}MMAF$  (группа А),  $Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}mcDM1$  (группа Б) в дозе 2,9 мг/кг, в контрольных группах аналогичным образом вводили контрольные вещества  $Z_{Taq}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}MMAF$  (группа В) или PBS (группа Г) в дозе 2,9 мг/кг. Инъекции проводились один раз в неделю в течение пяти последовательных недель (в день 0, день 7, день 14, день 21 и день 28).

Масса тела мышей и объем опухолей контролировались два раза в неделю. Опухоли измерялись по наибольшему продольному (длина) и перпендикулярному длине диаметру (ширина) с помощью цифрового штангенциркуля, объемы опухолей рассчитывались по формуле 2:

$$\text{Объем опухоли, мм}^3 = A \times B^2 \times 0,5 \quad (2),$$

где  $A$  – длина опухоли (наибольший диаметр) (мм),

$B$  – ширина опухоли (диаметр, перпендикулярный длине) (мм).

В начале исследования (день 0) средняя масса тела мышей составила  $17,7 \pm 1,0$  г ( $17,7 \pm 1,4$  г в группе А,  $17,8 \pm 0,6$  г в группе Б,  $17,6 \pm 1,0$  г в группе В,  $17,7 \pm 1,1$  г в группе Г, без значимой разницы между группами,  $p > 0,05$ ). Средний объем опухоли в начале исследования (день 0) составил  $85 \pm 19$  мм<sup>3</sup>, ( $80 \pm 21$  мм<sup>3</sup> в группе А,  $83 \pm 17$  мм<sup>3</sup> в группе Б,  $93 \pm 14$  мм<sup>3</sup> в группе В,  $84 \pm 25$  мм<sup>3</sup> в группе Г, без значимой разницы между группами,  $p > 0,05$ ).

Мышей подвергали эвтаназии в заранее определенной гуманной конечной точке, когда объем опухоли достигал 1 см<sup>3</sup>, на поверхности опухоли появлялась язва опухоли, наблюдалась 10 % потеря массы тела менее чем за неделю или общая потеря массы тела 15 %. Продолжительность исследования составляла 90 дней в соответствии с требованиями этического разрешения комитета по исследованиям животных Уппсальского университета (разрешение 5.8.18–11931/2020 от 28.08.2020). После умерщвления мышей почки и печень собирались и помещались во флаконы с 10 % формалином на 24 часа и далее хранились в 70 % этаноле при температуре 4 °С. Образцы тканей двух мышей из групп А, Б, Г были использованы для патологического исследования, проведенного ветеринарным патологом в ветеринарной диагностической лаборатории BioVet АВ (Соллентуна, Швеция).

Степень торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле 3:

$$\text{ТРО, \%} = (V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}) / V_{\text{контроль}} \times 100 \quad (3),$$

где  $V$  – объем опухоли (мм<sup>3</sup>).

Увеличение медианной продолжительности жизни (УПЖ) рассчитывали по формуле:

$$\text{УПЖ, \%} = \text{МПЖ}_{\text{опыт}} - \text{МПЖ}_{\text{контроль}} / \text{МПЖ}_{\text{контроль}} \times 100 \% \quad (4),$$

где МПЖ – медианная продолжительность жизни (дни).

Построение кривых выживаемости Каплана–Мейера и анализ данных осуществлялись с использованием логрангового критерия Мантеля–Кокса. Результаты терапии (отсутствие ответа, частичный ответ, устойчивая ремиссия, полная ремиссия) анализировались с помощью критерия хи-квадрат. Анализы проводились с использованием программы Prism, версии 9.3.1 (Graphpad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

## 2.9 Статистический анализ

Для определения статистически значимых различий при сравнении двух значений использовался двусторонний непарный t-тест, при сравнении нескольких межгрупповых значений использовался однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим post-hoc анализом по методу Тьюки. Знаки: \* соответствует  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ . Построение кривых выживаемости Каплана–Мейера и анализ данных в терапевтическом исследовании осуществлялись с использованием логрангового критерия Мантеля–Кокса. Результаты терапии (отсутствие ответа, частичный ответ, устойчивая ремиссия, полная ремиссия) анализировались с помощью критерия хи-квадрат. Анализы проводились с использованием программы Prism, версии 9.3.1 (Graphpad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Получение и оценка качества таргетных терапевтических конъюгатов

Для группы конъюгатов с различными междоменными линкерами слитые белки  $Z_{HER2}-(G_3S)_3-ABD$ ,  $Z_{HER2}-(S_3G)_3-ABD$ ,  $Z_{HER2}-G_4S-ABD$  были рекомбинантно экспрессированы в *Escherichia coli* с последующей очисткой с помощью эксклюзионной хроматографии с использованием ЧСА в качестве лиганда. Цитотоксический агент DM1 был сайт-специфически присоединен через линкер малеимидокапроил (mc) к остатку цистеина на С-конце каждого слитого белка. Нетоксичные контрольные конструкции  $Z_{HER2}-(G_3S)_3-ABD-AA$  и  $Z_{HER2}-(S_3G)_3-ABD-AA$ , были получены путем алкилирования С-концевого цистеина слитых белков. После реакций конъюгации или алкилирования контроль качества и очистку полученных конструкций осуществляли методом ОФ-ВЭЖХ, что обеспечивало удаление примесей неконъюгированных слитых белков и свободного DM1. Конечные продукты подвергали анализу SDS-PAGE и масс-спектрометрии.

Анализ методом эксклюзионной хроматографии продемонстрировал четкое разделение всех конструкций на отдельные пики, подтверждая их мономерное состояние и отсутствие деградированных форм (рисунок 11А). Согласно анализу аналитической ОФ-ВЭЖХ, чистота всех конструкций составила свыше 95 %. При этом нетоксичные контрольные конструкции,  $Z_{HER2}-(G_3S)_3-ABD-AA$  и  $Z_{HER2}-(S_3G)_3-ABD-AA$ , показали более раннее время элюции по сравнению с DM1-конъюгатами, что указывает на повышение гидрофобности молекул после конъюгации с цитотоксином (рисунок 11Б). Анализ SDS-PAGE (рисунок 12) и масс-спектрометрия (приложение А,

рисунок А1) показали конструкции с ожидаемыми молекулярными массами и подтвердили высокую чистоту конъюгатов.

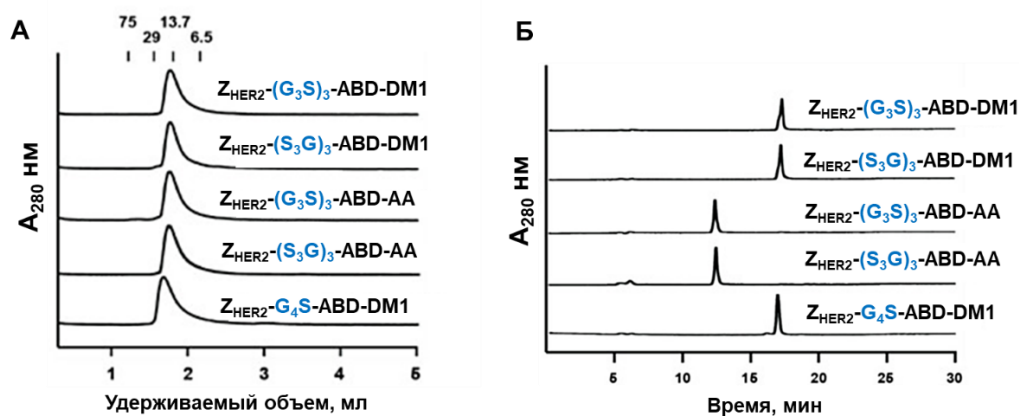
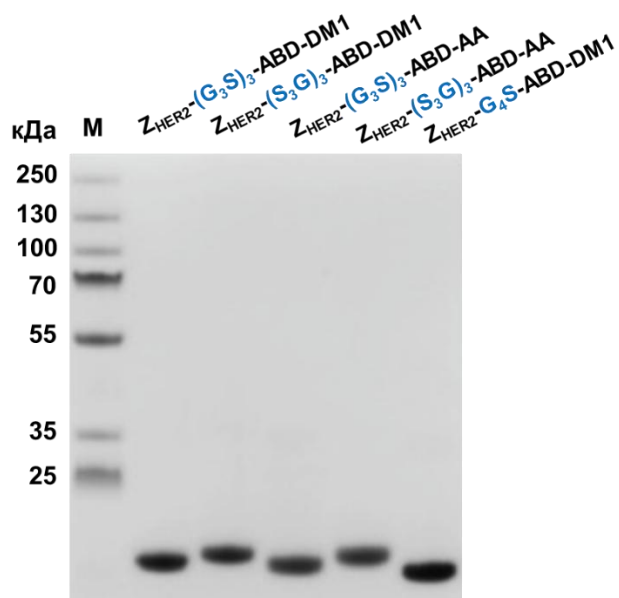


Рисунок 11 – Хроматограммы, полученные в ходе эксклюзионной хроматографии (А), цифры указывают объемы элюирования стандартных образцов белков; и хроматограммы, полученные в ходе анализа ОФ-ВЭЖХ (Б) для для группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров



М, маркер молекулярного веса белков; кДа, килодальтон

Рисунок 12 – Анализ SDS-PAGE группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров

Для группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения слитые белки  $Z_{HER2}$ -**XTEN288**,  $Z_{HER2}$ -**XTEN576**,  $Z_{HER2}$ -**PAS300**,  $Z_{HER2}$ -**PAS600** и  $Z_{HER2}$ -**G4S-ABD** были рекомбинантно экспрессированы в *Escherichia coli* с последующей очисткой с помощью аффинной хроматографии. Сайт-специфическая конъюгация цитотоксина DM1 проводилась по С-концевым цистеинам слитых белков с использованием тс-линкера. Для очистки и контроля качества полученных конъюгатов применяли ОФ-ВЭЖХ, позволяющую эффективно разделять конъюгированные формы от исходных слитых белков и свободного DM1. Далее конъюгаты оценивали с использованием SDS-PAGE и масс-спектрометрического анализа.

Анализ методом эксклюзионной хроматографии показал четкое разделение пяти конъюгатов на отдельные пики, что указывает на отсутствие мультимерных форм или продуктов деградации (Рисунок 13А). Согласно анализу ОФ-ВЭЖХ, чистота конъюгатов группы составила свыше 99 % (рисунок 13Б). Конъюгат  $Z_{HER2}$ -**G4S-ABD-DM1** продемонстрировал большее время удерживания по сравнению с PAS- и XTEN-содержащими конструкциями, что указывает на более гидрофобный характер данного конъюгата. Анализ SDS-PAGE показал высокую чистоту конъюгатов, однако конъюгаты, содержащие полипептиды PAS и XTEN, мигрировали через гель медленнее, чем ожидалось, исходя из их молекулярной массы. В методе SDS-PAGE разделение белков осуществляется преимущественно в соответствии с их молекулярной массой, однако электрофоретическая подвижность макромолекул дополнительно зависит от таких факторов, как конформационные особенности белка, величина поверхностного заряда и степень гидрофобности полипептидной цепи [130]. Маркерные белки, используемые в качестве стандартов в SDS-PAGE, представляют собой глобулярные белки и в геле под действием электрического поля движутся пропорционально их молекулярной массе. Полимеры XTEN и PAS

представляют собой гидрофильные, неструктурированные и высокогидратированные полипептиды и проявляют нетипичную подвижность при электрофорезе по ряду причин [81, 157]. Неструктурированные белки, в отличие от глобулярных белков, ввиду низкой гидрофобности связывают меньше додецилсульфата натрия (SDS) и поэтому мигрируют медленнее, имитируя большую молекулярную массу, а высокая гидратированность дополнительно увеличивает их эффективный размер в геле. Кроме того, XTEN- и PAS-полимеры могут образовывать слабые олигомеры или агрегаты, которые могут не полностью полностью диссоциировать в денатурирующих условиях SDS-PAGE [65, 205]. Масс-спектрометрический анализ, являющийся более точным методом определения молекулярной массы для таких полимеров (приложение А, рисунок А2), подтвердил теоретически рассчитанные молекулярные массы и высокую чистоту конъюгатов.

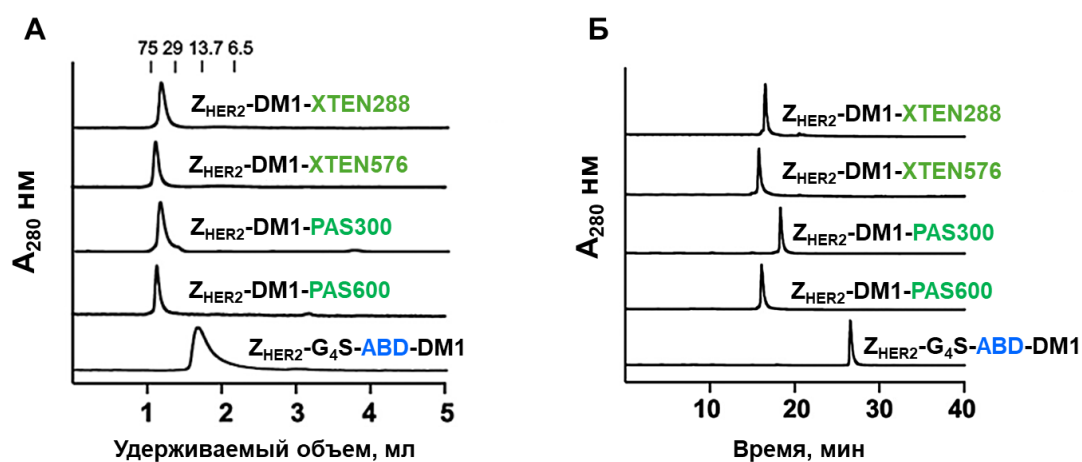
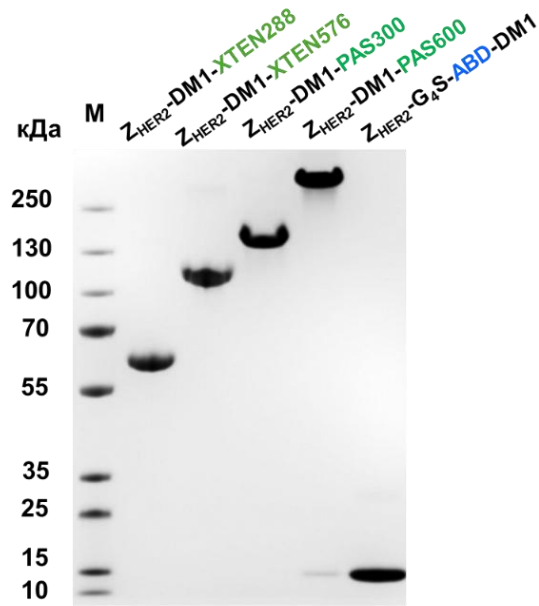


Рисунок 13 – Хроматограммы, полученные в ходе эксклюзионной хроматографии (А), цифры указывают объемы элюирования стандартных образцов белков; и хроматограммы, полученные в ходе анализа ОФ-ВЭЖХ (Б) для для группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, для увеличения периода полуведения



M, маркер молекулярного веса белков; кДа, килодальтон

Рисунок 14 – Анализ SDS-PAGE группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров

Для группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами слитые белки  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD}$  и  $Z_{Taq}\text{-G}_4\text{S-ABD}$  (контрольная нецелевая конструкция) были рекомбинантно экспрессированы в *Escherichia coli* с последующей очисткой с помощью эсклюзионной хроматографии с использованием ЧСА в качестве лиганда. Цитотоксические агенты DM1, MMAE и MMAF были конъюгированы с С-концевым цистеином слитых белков  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD}$  посредством mc-линкера. Аналогичным образом, контрольная конструкция  $Z_{Taq}\text{-G}_4\text{S-ABD}$  была конъюгирована с mcMMAF посредством С-концевого цистеина. Полученные конъюгаты были очищены и оценены с помощью ОФ-ВЭЖХ, и проанализированы методами SDS-PAGE и масс-спектрометрии.

Эсклюзионная хроматография показала высокую чистоту мономерных конъюгатов (рисунок 15А). Согласно анализу ОФ-ВЭЖХ чистота конъюгатов составила более 95 % (рисунок 15Б). Конъюгаты  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAE}$  и  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$  продемонстрировали большее время удерживания по сравнению с  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ , что указывает на более выраженные

гидрофобные свойства данных конструкций. Нецелевая контрольная конструкция  $Z_{Taq}$ -G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF была элюирована последней, что свидетельствует о её наибольшей гидрофобности среди исследуемых конструкций. Масс-спектрометрический анализ (приложение А, рисунок А3) и анализ SDS-PAGE (рисунок 16) подтвердили теоретически рассчитанные молекулярные массы и высокую чистоту конъюгатов.

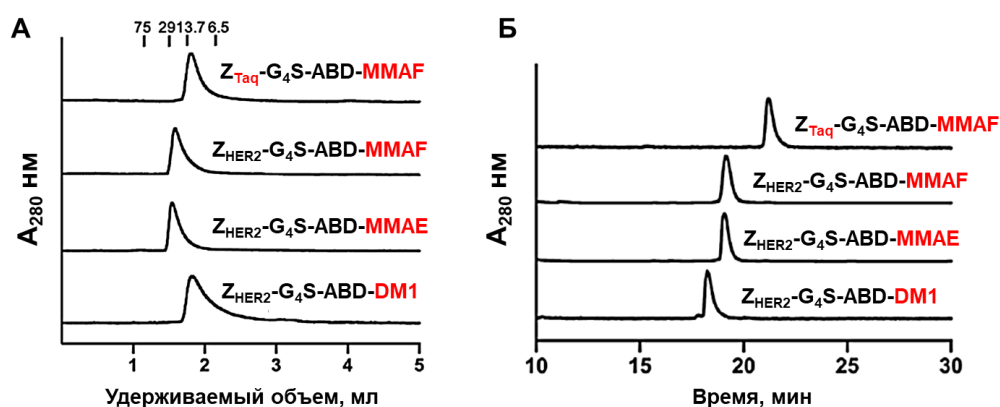
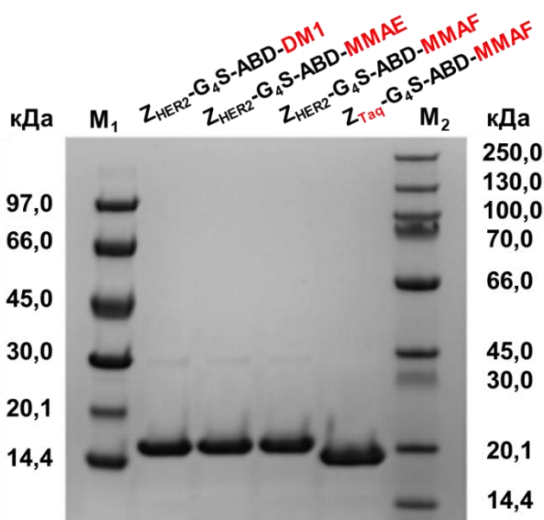


Рисунок 15 – Хроматограммы, полученные в ходе эксклюзионной хроматографии (А), цифры указывают объемы элюирования стандартных образцов белков; и хроматограммы, полученные в ходе анализа ОФ-ВЭЖХ (Б) для группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами



M, маркер молекулярного веса белков; кДа, килодальтон

Рисунок 16 – Анализ SDS-PAGE группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами

### 3.2 Результаты получения радиокомплексов таргетных терапевтических конъюгатов

Для осуществления исследований *in vitro* и *in vivo* изучаемых конъюгатов было проведено сайт-специфическое мечение конъюгатов технецием-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Использование радионуклидной метки является привлекательным подходом для изучения взаимосвязи структуры и функции белковых молекул и позволяет получать количественную информацию, такую как специфичность и аффинность связывания, скорость интернализации, а также оценивать биораспределение в крови и других органах и тканях. Важное значение имеет выбор подходящей радионуклидной метки. Технеций-99m является одним из наиболее широко используемых радионуклидов в доклинических исследованиях благодаря ряду благоприятных физико-химических свойств: оптимальное для детекции  $\gamma$ -излучение с энергией 140 кэВ, период полураспада 6 часов, доступность и удобство получения посредством  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -генератора, способность образовывать комплексы с различными лигандами и возможность радиомечения белковых молекул [144, 207].

Для введения  $^{99m}\text{Tc}$  в структуру биомолекулы необходимо преобразовать семивалентный  $^{99m}\text{Tc}$  (VII), выделяемый из генератора  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  в виде элюата натрия пертехнетата ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ), до реакционноспособных форм, способных к комплексообразованию. Широко используемым прекурсором для мечения пептидов и белков является трикарбонильный технеций-99m  $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , содержащий ионы восстановленного  $^{99m}\text{Tc}$  (I) [171]. Мы применили сайт-специфическое мечение трикарбонильным технецием-99m с использованием предварительно введённой аминокислотной последовательности гистидил-глутамата  $(\text{HE})_3$  на N-конце молекулы

конструкции слитого белка. Этот метод радиомечения оказывает минимальное влияние на связывающие свойства молекул аффибоди, поскольку радионуклидная метка и сайт связывания молекулы аффибоди пространственно разделены. Радионуклидная метка  $^{99m}\text{Tc}$  является остаточной, т. е. она захватывается в лизосомальном компартменте после интернализации и протеолитической деградации, что позволяет оценивать скорости интернализации меченных конструкций. Кроме того, биораспределение молекул аффибоди, меченных с использованием данного подхода и других методов сайт-специфического радиомечения схоже [75, 95]. Это позволяет предположить, что предлагаемый метод существенно не изменяет свойства молекул аффибоди *in vivo*.

Конъюгаты всех исследуемых групп показали высокие радиохимические выходы. Для группы конъюгатов с различными линкерами радиохимические выходы составили более 93 %. Радиохимическая чистота конъюгатов после очистки с помощью эксклюзионной хроматографии составила свыше 98 %. При оценке стабильности с 1000-кратным избытком гистидина в течение 4 часов инкубации наблюдалось незначительное высвобождение активности в группе с гистидином и в контрольной группе с раствором PBS (от 0 до 1 %). Полные результаты радиосинтеза представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты радиосинтеза и оценка стабильности группы конъюгатов с различными полипептидными линкерами, меченных  $^{99m}\text{Tc}$  ( $M \pm SD$ )

Конъюгат	Радиохимический выход (%)	Радиохимическая чистота (%)	Стабильность (%)	
			1000x гистидин	Контроль (PBS)
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-(G}_3\text{S)}_3\text{-ABD-DM1}$	$95 \pm 1$ (n = 4)	$99 \pm 2$ (n = 2)	$98 \pm 0$ (n = 2)	$98 \pm 0$ (n = 2)
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-(S}_3\text{G)}_3\text{-ABD-DM1}$	$93 \pm 2$ (n = 4)	$98 \pm 2$ (n = 2)	$98 \pm 0$ (n = 2)	$98 \pm 1$ (n = 2)
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$	$96 \pm 1$ (n = 6)	$99 \pm 1$ (n = 2)	$98 \pm 0$ (n = 2)	$99 \pm 0$ (n = 2)

Для группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, радиохимические выходы составили свыше 74 %. Радиохимическая чистота конъюгатов после очистки с помощью эксклюзионной хроматографии составила более 98 %. Оценка стабильности с использованием 1000-кратного избытка гистидина в течение 4 часов инкубации выявила незначительное высвобождение активности (4 %) для конъюгата с полипептидом PAS600 и отсутствие значительного высвобождения активности для других конъюгатов как в гистидине (от 0 до 3 %), так и в контрольной группе (от 0 до 1 %). Полные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты радиосинтеза и оценка стабильности группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, меченных  $^{99m}\text{Tc}$  ( $M \pm SD$ )

Конъюгат	Радиохимический выход (%)	Радиохимическая чистота (%)	Стабильность (%)	
			Гистидин	Контроль (PBS)
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN288}$	$74 \pm 5$	$98 \pm 2$	$98 \pm 1$	$97 \pm 1$
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN576}$	$82 \pm 4$	$98 \pm 1$	$98 \pm 0$	$100 \pm 0$
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS300}$	$90 \pm 3$	$99 \pm 1$	$100 \pm 0$	$100 \pm 0$
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS600}$	$91 \pm 1$	$99 \pm 0$	$96 \pm 0$	$99 \pm 0$
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-G4S-ABD-DM1}$	$94 \pm 2$	$100 \pm 0$	$97 \pm 1$	$98 \pm 1$

Для группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами были определены высокие радиохимические выходы (свыше 96 %). Радиохимическая чистота конъюгатов после очистки с помощью эксклюзионной хроматографии составила более 97 %. После теста оценки стабильности с 1000-кратным избытком гистидина в течение 4 часов инкубации и в контрольной группе с раствором PBS наблюдалось незначительное высвобождение активности (2 %) для конъюгата с

цитотоксическим агентом DM1 и отсутствие значительного высвобождения активности для других конъюгатов как в гистидине, так и в контрольной группе (от 0 до 1 %). Полные результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты радиосинтеза и оценка стабильности группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами, меченных  $^{99m}\text{Tc}$  ( $M \pm SD$ )

Конъюгат	Радиохимический выход (%)	Радиохимическая чистота (%)	Стабильность (%)	
			Гистидин	Контормоль (PBS)
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-G4S-ABD-mcDM1}}$	$96 \pm 4$ (n = 6)	$99 \pm 1$ (n = 3)	$97 \pm 0$ (n = 2)	$97 \pm 1$ (n = 2)
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-G4S-ABD-MMAE}}$	$96 \pm 3$ (n = 6)	$97 \pm 1$ (n = 3)	$100 \pm 0$ (n = 2)	$100 \pm 0$ (n = 2)
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-G4S-ABD-MMAF}}$	$97 \pm 1$ (n = 8)	$99 \pm 2$ (n = 3)	$100 \pm 0$ (n = 2)	$99 \pm 1$ (n = 2)

### 3.3 Изучение функциональной пригодности таргетных терапевтических конъюгатов в исследованиях *in vitro*

#### 3.3.1 Результаты оценки цитотоксичности и определение IC<sub>50</sub>

Для исследования корреляции между цитотоксическим эффектом и уровнем экспрессии HER2 были использованы клеточные линии с высоким и низким уровнем экспрессии HER2, которые культивировали с серией разведений конъюгатов, после чего рассчитывали жизнеспособность клеток.

Для клеток с высокой экспрессией HER2 (SKOV3, SKBR3 и AU565) конъюгаты с различным составом междоменных линкеров,  $Z_{\text{HER2-(G}_3\text{S)}_3\text{-ABD-DM1}}$ ,  $Z_{\text{HER2-(S}_3\text{G)}_3\text{-ABD-DM1}}$  и  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-DM1}}$ , показали дозозависимый цитотоксический эффект (рисунок 17 и таблица 6). Для клеточной линии SKOV3 кривые «доза–эффект» имели более пологую форму, по сравнению с кривыми для других клеточных линий с высоким уровнем экспрессии HER2, что свидетельствует о меньшей восприимчивости клеток SKOV3 к

цитотоксическому воздействию исследуемых конъюгатов. В более ранних исследованиях клеточная линия SKOV3 также оказывалась более устойчивой в отношении HER2-направленных аффибоди и других каркасных белков, конъюгированных с цитотоксинами [105, 121, 178]. Данные различия могут быть связаны с различиями в скорости интернализации рецептора, уровне экспрессии белков множественной лекарственной устойчивости и различиями в эффективности лизосомальной деградации [67]. Кроме того, в клеточной линии SKOV3 важным фактором являются инактивирующие мутации в гене-супрессоре опухоли TP53 и экспрессия мутантных форм белков семейства p53, снижающих индукцию апоптоза клетки в ответ на цитотоксический стресс (повреждение ДНК, потеря структурной целостности микротрубочек) [4]. Наиболее сильный цитотоксический эффект в клетках SKOV3 продемонстрировал конъюгат с линкером  $(G_3S)_3$ , значение  $IC_{50}$  для которого составило 48 нМ, в то время как значения  $IC_{50}$  для  $Z_{HER2}-(S_3G)_3$ -ABD-DM1 и  $Z_{HER2}-G_4S$ -ABD-DM1 составили 150 нМ и 180 нМ, соответственно. Выявление молекулярной конструкции, увеличивающей цитотоксическое воздействие против данной клеточной линии, имеет существенное значение.

Для клеточной линии SKBR3, напротив, цитотоксический эффект был сильнее для конъюгата с линкером  $G_4S$  по сравнению с конъюгатами с линкерами  $(G_3S)_3$  и  $(S_3G)_3$ . Для клеточной линии AU565 значения  $IC_{50}$  были схожими среди группы конъюгатов и варьировались от 1,2 до 2,4 нМ. В клеточных линиях с низким/средним уровнем экспрессии HER2, как в A549, так и MCF7, исследуемые конъюгаты не показали цитотоксического эффекта, за исключением наиболее высокой концентрации. Нетоксичный контроль  $Z_{HER2}-(G_3S)_3$ -ABD-AA не повлиял на жизнеспособность ни одной из клеточных линий.

Таблица 6 – Результаты оценки цитотоксичности *in vitro* группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров ( $M \pm SD$ )

Конъюгат	IC <sub>50</sub> (нМ)		
	SKOV3	SKBR3	AU565
Z <sub>HER2</sub> -(G <sub>3</sub> S) <sub>3</sub> -ABD-DM1	40 ± 7	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,3
Z <sub>HER2</sub> -(S <sub>3</sub> G) <sub>3</sub> -ABD-DM1	150 ± 10	2,7 ± 0,8	2,4 ± 0,4
Z <sub>HER2</sub> -G <sub>4</sub> S-ABD-DM1	180 ± 11	0,97 ± 0,3	1,2 ± 0,3

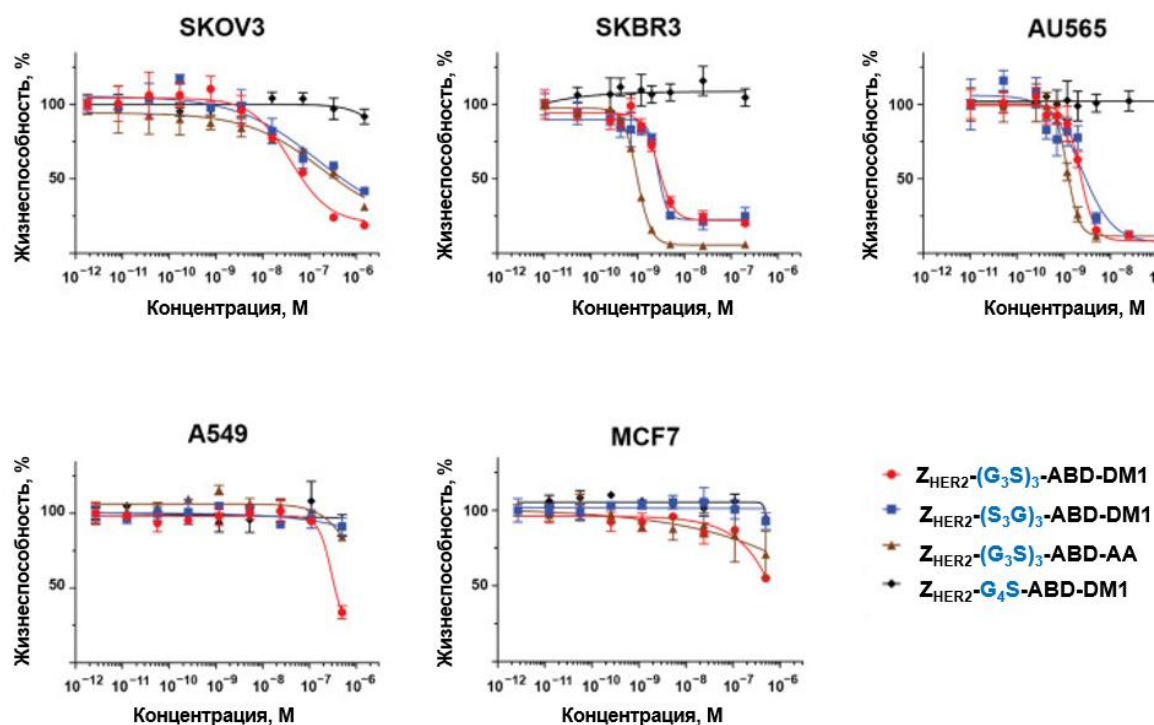


Рисунок 17 – Результаты оценки цитотоксичности *in vitro* группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров ( $M \pm SD$ )

Результаты цитотоксичности для группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, представлены на рисунке 18 и в таблице 7. В клеточной линии SKOV3 значения IC<sub>50</sub> были схожи среди конъюгатов группы и варьировались от 26 нМ до 43 нМ. Для клеточной линии AU565 значения варьировались от 0,6 нМ до 2,6 нМ, с наиболее сильным эффектом для Z<sub>HER2</sub>-DM1-PAS600 и Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1. В клеточной линии SKBR3 наиболее сильный цитотоксический эффект продемонстрировал конъюгат Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1 (IC<sub>50</sub> = 0,7 нМ), по

сравнению с остальными конъюгатами группы, где значения  $IC_{50}$  варьировались от 4,1 нМ до 9,6 нМ. При этом кривые выживаемости для конъюгатов с полипептидами XTEN и PAS имели форму, отличную от формы кривой  $Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$ , с более пологим наклоном вблизи значения  $IC_{50}$ . В клеточных линиях AU565 и SKBR3 цитотоксичность всех конъюгатов группы была аналогична цитотоксичности исследуемого ранее  $Z_{HER2-DM1}$ , не имеющего полипептидных фрагментов для увеличения периода полувыведения. Однако в клеточной линии SKOV3 конъюгат  $Z_{HER2-DM1}$  имел более чем в 10 раз превышающую цитотоксичность по сравнению с исследуемыми конъюгатами группы [25]. В клеточных линиях с низким/средним уровнем экспрессии HER2, как в A549, так и MCF7, исследуемые конъюгаты не показали цитотоксического эффекта, за исключением наиболее высокой концентрации  $Z_{HER2-DM1-PAS300}$  и  $Z_{HER2-DM1-PAS600}$ .

Таблица 7 – Результаты оценки цитотоксичности *in vitro* группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения ( $M \pm SD$ )

Конъюгат	$IC_{50}$ (нМ)		
	SKOV3	SKBR3	AU565
$Z_{HER2-DM1-XTEN288}$	43 ± 4	5,7 ± 1	1,5 ± 0,01
$Z_{HER2-DM1-XTEN576}$	26 ± 2	8,3 ± 1	2,8 ± 0,2
$Z_{HER2-DM1-PAS300}$	30 ± 2	9,6 ± 2	2,6 ± 0,1
$Z_{HER2-DM1-PAS600}$	41 ± 3	4,1 ± 0,3	0,6 ± 0,03
$Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$	34 ± 2	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1

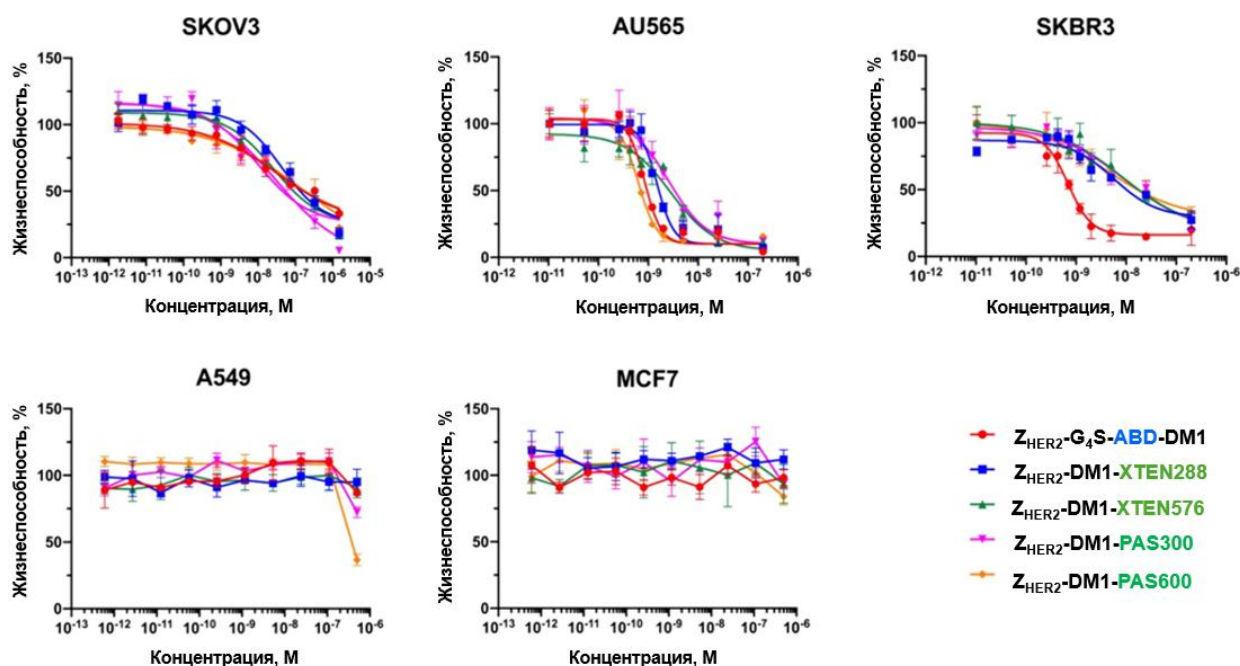


Рисунок 18 – Результаты оценки цитотоксичности *in vitro* группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения ( $M \pm SD$ )

Результаты цитотоксичности для группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами представлены на рисунке 19 и в таблице 8. Среди клеточных линий с высокой экспрессией HER2 (SKOV3, SKBR3, BT474 и AU565) клеточная линия BT474 оказалась наиболее устойчивой к цитотоксическому воздействию конъюгатов. Цитотоксический эффект для клеточной линии BT474 был установлен только для конъюгата  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$  со значением  $IC_{50} = 0,01$  нМ и с выживаемостью от 40 % до 50 % клеток. В клеточной линии SKOV3 наблюдалась значительная разница в значениях  $IC_{50}$  исследуемых конъюгатов, среди которых конъюгат  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$  показал наибольшую эффективность цитотоксического воздействия ( $IC_{50} = 12$  нМ). Конъюгат  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$  показал в 40 раз более низкую эффективность по сравнению с  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$ . Конъюгат  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAE}$  не оказывал цитотоксического воздействия в клеточной линии SKOV3 ни при одной из используемых концентраций. При максимальной использованной концентрации (1000 нМ) наблюдался

цитотоксический эффект контрольного вещества  $Z_{\text{Taq}}\text{-ABD-MMAF}$ , но не наблюдался для конъюгата  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAE}}$ . Кроме того, были определены более пологие кривые «доза-эффект» и низкий цитотоксический эффект конъюгата с MMAE по сравнению с конъюгатами с другими цитотоксинами, что может объясняться использованием малеимидакапроильного линкера mc.

Клеточные линии SKBR3 и AU565 были более чувствительны к цитотоксическому действию всех конъюгатов по сравнению со SKOV3. В клеточной линии SKBR3 конъюгат  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$  показал в 10 раз превосходящий цитотоксический эффект в сравнении с конъюгатами  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-DM1}}$  и  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAE}}$ . Для клеток AU565 конъюгат  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$  также показал наиболее высокую цитотоксичность, с десятикратно более низким значением  $IC_{50}$  по сравнению с  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-DM1}}$  и 100-кратно более низким значением  $IC_{50}$  по сравнению с  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAE}}$ . В клеточной линии MCF7 с низкой экспрессией HER2 определен только незначительный эффект цитотоксичности конъюгатов  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAE}}$  и  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$ . Нецелевой контроль  $Z_{\text{Taq-ABD-MMAF}}$  в клеточных линиях с высокой экспрессией HER2 показал в 10–1000 раз меньшую цитотоксичность по сравнению с наиболее эффективным конъюгатом  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$ , оказывал незначительное цитотоксическое влияние на клетки A549 с умеренной/низкой экспрессией HER2 и не оказывал цитотоксического воздействия на клетки MCF7 с низкой экспрессией HER2.  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$  был наиболее эффективным лекарственным конъюгатом в этом эксперименте.

Таблица 8 – Результаты оценки цитотоксичности группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами ( $M \pm SD$ )

Конъюгат	IC <sub>50</sub> (нМ)				
	SKOV3	SKBR3	AU565	BT474	A549
Z <sub>HER2</sub> -G <sub>4</sub> S-ABD-DM1	412 ± 17	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,02	-	-
Z <sub>HER2</sub> -G <sub>4</sub> S-ABD-MMAF	12 ± 1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,01	0,01 ± 0,01	215 ± 19
Z <sub>HER2</sub> -G <sub>4</sub> S-ABD-MMAE	-	8,2 ± 0,9	24 ± 3	-	-
Z <sub>Taq</sub> -G <sub>4</sub> S-ABD-MMAF	190 ± 12	170 ± 10	180 ± 14	110 ± 12	-

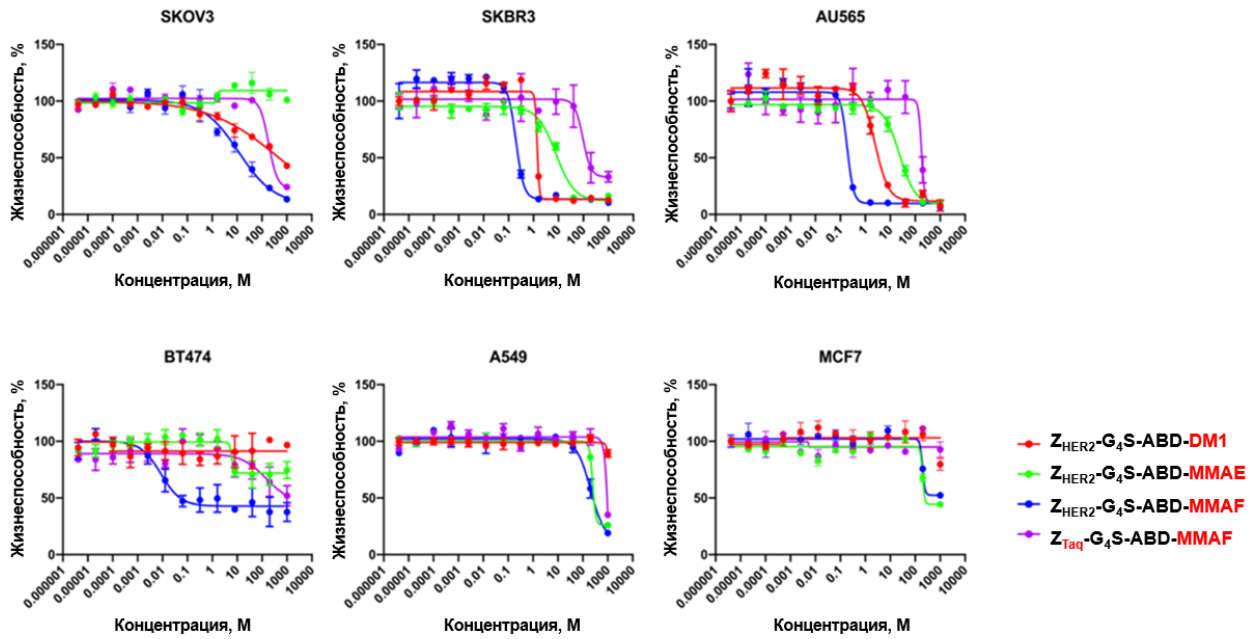


Рисунок 19 – Результаты оценки цитотоксичности группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами ( $M \pm SD$ )

### 3.3.2 Результаты оценки специфичности связывания

Результаты оценки специфичности связывания представлены на рисунках 20–22. После предварительного насыщения рецепторов HER2 большим молярным избытком немеченных конъюгатов, во всех исследуемых HER2-экспрессирующих клеточных линиях значимо ( $p < 0,05$ ) снижалось поглощение активности в блокированной группе по сравнению с

неблокированной группой. Результаты указывают на HER2-опосредованное специфичное связывание всех исследуемых конъюгатов.

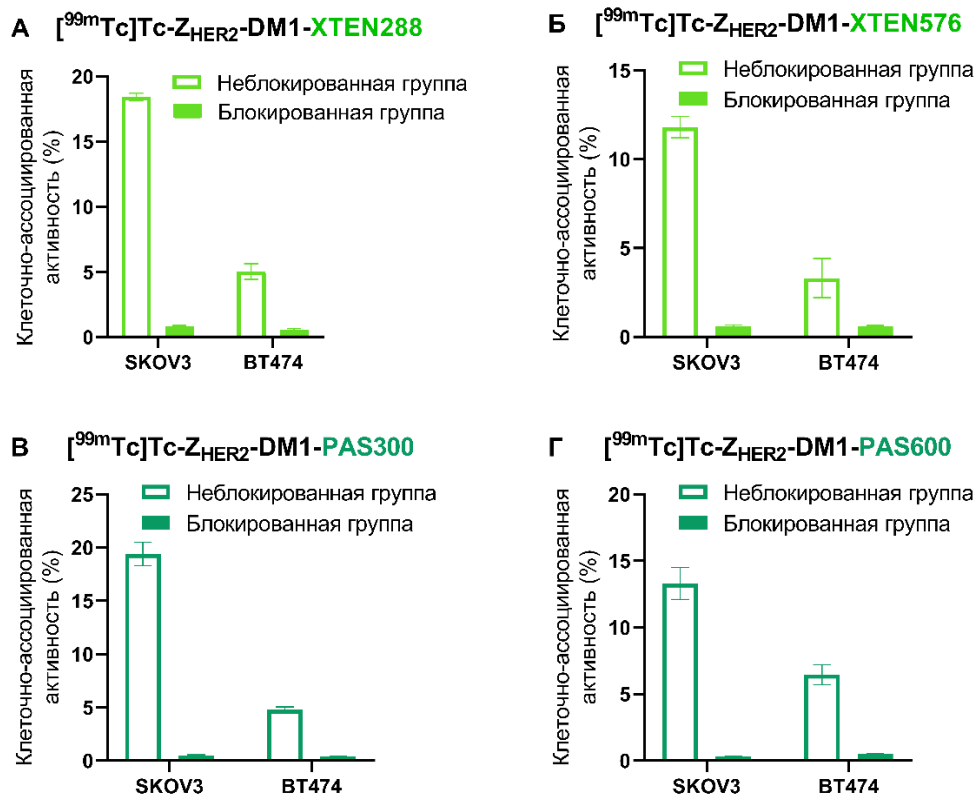


Рисунок 20 – Результаты оценки специфичности связывания *in vitro* группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения ( $M \pm SD$ )

Уровень связанной с клетками активности коррелировал с уровнем экспрессии HER2. Наиболее высокие уровни связывания для всех конъюгатов (10–18 % клеточно-ассоциированной активности) были определены в клеточной линии SKOV3 ( $1,6 \times 10^6$  рецептор/клетка). Уровни связывания в клеточной линии BT474 ( $1,2 \times 10^6$  рецептор/клетка) соответственно составили 4–11 % клеточно-ассоциированной активности.

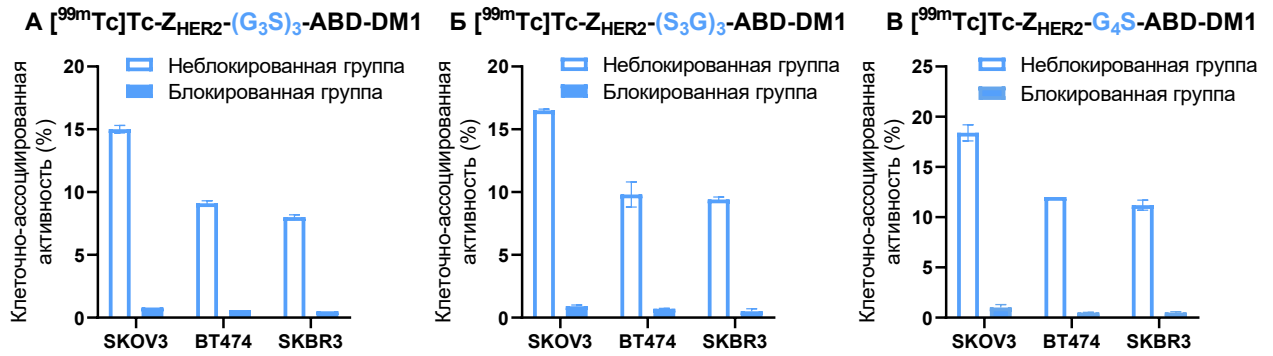


Рисунок 21 – Результаты оценки специфичности связывания *in vitro* группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров ( $M \pm SD$ )

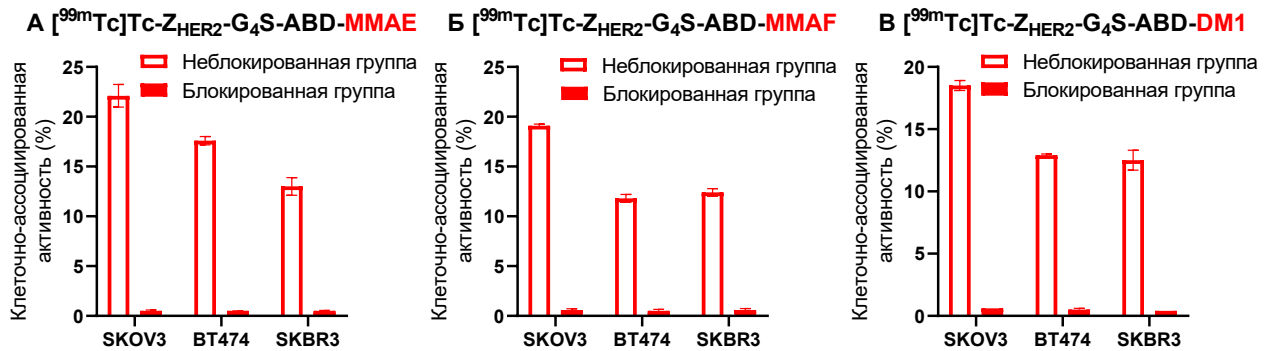


Рисунок 22 – Результаты оценки специфичности связывания *in vitro* группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами ( $M \pm SD$ )

### 3.3.3 Результаты оценки аффинности связывания

Для измерения аффинности и кинетики связывания исследуемых конъюгатов с HER2-экспрессирующими клетками SKOV3 в режиме реального времени использовали прибор LigandTracer Yellow (Ridgeview Instruments, Väinge, Швеция). За сутки до эксперимента на локальную область чашки Петри высевали клетки SKOV3 в количестве  $2 \times 10^6$  клеток. В день эксперимента в каждую чашку поэтапно добавляли возрастающие концентрации (1, 2 и 5 нМ) соответствующего  $^{99m}\text{Tc}$ -меченного конъюгата для измерения фазы ассоциации. Для измерения фазы диссоциации среду, содержащую  $^{99m}\text{Tc}$ -

меченные конъюгаты, заменяли на среду без конъюгатов. Данные были скорректированы с учетом распада нуклидов и проанализированы с помощью программного обеспечения Tracedrawer (Ridgeview Instruments) для определения констант равновесной диссоциации ( $K_d$ ).

Для всех групп конъюгатов были выявлены два значения констант равновесной диссоциации ( $K_d$ ) и два сайта связывания, соответственно, –  $K_{d1}$  с высоким сродством к HER2 в низком наномолярном диапазоне и  $K_{d2}$  со сродством в субнаномолярном диапазоне. Это явление характерно для HER2-направленных лигандов, и, в частности, для молекул аффибоди, и объясняется тем, что рецептор HER2 подвергается гомо- и гетеродимеризации. Молекула аффибоди, в свою очередь, способна связываться с HER2 в разных конформационных состояниях – мономерном или димерном [158].

Результаты измерения констант равновесной диссоциации ( $K_d$ ) группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров, меченных  $^{99m}\text{Tc}$ , представлены в таблице 9. Выявлена высокая аффинность к HER2 в низком наномолярном диапазоне для всей группы.

Таблица 9 – Константы равновесной диссоциации ( $K_d$ ) взаимодействий группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров, меченных  $^{99m}\text{Tc}$ , и рецепторов HER2 в клеточной линии SKOV3 ( $M \pm SD$ )

Конъюгат	$K_{d1}$ , нМ	$K_{d2}$ , нМ
$Z_{\text{HER2}}-(\text{G}_3\text{S})_3\text{-ABD-DM1}$	$1,3 \pm 0,4$	$22,5 \pm 0,7$
$Z_{\text{HER2}}-(\text{S}_3\text{G})_3\text{-ABD-DM1}$	$1,0 \pm 0,4$	$17,0 \pm 3,6$
$Z_{\text{HER2}}-\text{G}_4\text{S-ABD-DM1}$	$0,56 \pm 0,20$	$18,4 \pm 2,9$

Результаты измерения констант равновесной диссоциации ( $K_d$ ) группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, меченных  $^{99m}\text{Tc}$ , представлены в таблице 10. Аффинность конъюгатов группы определена в низком наномолярном и субнаномолярном диапазонах. Для конъюгатов с полипептидами PAS и ABD-

слитого конъюгата значения  $K_d$  определены ниже и, соответственно, более высокое сродство по сравнению с конъюгатами с полипептидами XTEN.

Таблица 10 – Константы равновесной диссоциации ( $K_d$ ) взаимодействий группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, меченных  $^{99m}\text{Tc}$ , и рецепторов HER2 в клеточной линии SKOV3 ( $M \pm SD$ )

Конъюгат	$K_{d1}$ , нМ	$K_{d2}$ , нМ
Z <sub>HER2</sub> -DM1-XTEN288	1,0 ± 0,2	18,9 ± 1,4
Z <sub>HER2</sub> -DM1-XTEN576	0,70 ± 0,05	20,1 ± 1,5
Z <sub>HER2</sub> -DM1-PAS300	0,37 ± 0,06	10,0 ± 1,6
Z <sub>HER2</sub> -DM1-PAS600	0,16 ± 0,02	7,0 ± 0,5
Z <sub>HER2</sub> -G4S-ABD-DM1	0,46 ± 0,14	19,7 ± 2,7

Результаты измерения констант равновесной диссоциации ( $K_d$ ) группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами, меченных  $^{99m}\text{Tc}$ , представлены в таблице 11. Аффинность конъюгатов группы определена в низком наномолярном и субнаномолярном диапазонах без значимых различий между конъюгатами с разными цитотоксинами.

Таблица 11 – Константы равновесной диссоциации ( $K_d$ ) взаимодействий группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами, меченных  $^{99m}\text{Tc}$ , и рецепторов HER2 в клеточной линии SKOV3 ( $M \pm SD$ )

Конъюгат	$K_{d1}$ , нМ	$K_{d2}$ , нМ
Z <sub>HER2</sub> -G4S-ABD-MMAE	0,44 ± 0,04	13,6 ± 0,6
Z <sub>HER2</sub> -G4S-ABD-MMAF	0,42 ± 0,02	15,5 ± 5,8
Z <sub>HER2</sub> -G4S-ABD-DM1	0,56 ± 0,20	18,4 ± 2,9

### 3.3.4 Результаты оценки интернализации

Для изучения интернализации  $^{99m}\text{Tc}$ -меченые конъюгаты в концентрации 1 нМ инкубировали с HER2-экспрессирующими клеточными линиями SKOV3 и BT474 в течение 24 часов и измеряли активность общей (мембранно-связанной) и интернализированной фракций. Определение эффективности интернализации терапевтических конъюгатов важно, так как цитотоксический агент, осуществляющий противоопухолевый эффект, высвобождается в результате лизосомального расщепления внутри клетки. Оценка интернализации проводилась с использованием остаточной метки трикарбонильного технеция- $^{99m}$ , что означает, что радиокатаболиты не диффундируют через клеточные мембраны и удерживаются внутри клеток после HER2-опосредованного эндоцитоза и деградации белка в лизосомах, и позволяет оценить скорости интернализации конструкций [206]. Характер клеточной интернализации был схожим для всех исследуемых конъюгатов. На первых временных точках инкубации наблюдалось быстрое связывание с рецепторами и их насыщение. Высокий уровень клеточного удержания был обеспечен прочным связыванием с рецепторами на поверхности клеток. Через 6 ч после добавления исследуемые конъюгаты эффективно интернализировались, при этом интернализированная активность медленно, но непрерывно увеличивалась, и не наблюдалось выраженного снижения клеточно-ассоциированной активности во время инкубации.

Результаты оценки интернализации группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения представлены на рисунках 23–27. Полипептиды XTEN имеют отрицательный поверхностный заряд. В исследовании F. Brandl с соавт. (2019), в котором на EpCAM-экспрессирующих клеточных линиях были изучены высокоаффинные молекулы DARPIn, слитые с полипептидами PAS или

ХТЕН, высказывалось предположение, что отрицательный заряд полипептидов ХТЕН может препятствовать клеточному поглощению содержащих их слитых белков [125]. Однако результаты оценки интернализации в клетках SKOV3 и BT474, экспрессирующих HER2, не продемонстрировали существенных различий в уровне интернализации между конъюгатами, содержащих полипептиды PAS (27–29 % для клеток SKOV3 и 25–28 % для клеток BT474 от общей клеточно-ассоциированной активности через 24 часа инкубации) и ХТЕН (28–31 % для клеток SKOV3 и 25–28 % для клеток BT474 от общей клеточно-ассоциированной активности через 24 ч инкубации). При этом уровень их интернализации также сопоставим с интернализацией [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2}}$ -**ABD**-DM1 (35 % для клеток SKOV3 и 22 % для клеток BT474 от общей клеточно-ассоциированной активности через 24 часа инкубации). Применение стратегий увеличения размера и гидродинамического радиуса аффибоди  $Z_{\text{HER2}}$  с полипептидными фрагментами ХТЕН, PAS или ABD не оказывает негативного влияния на скорость интернализации.

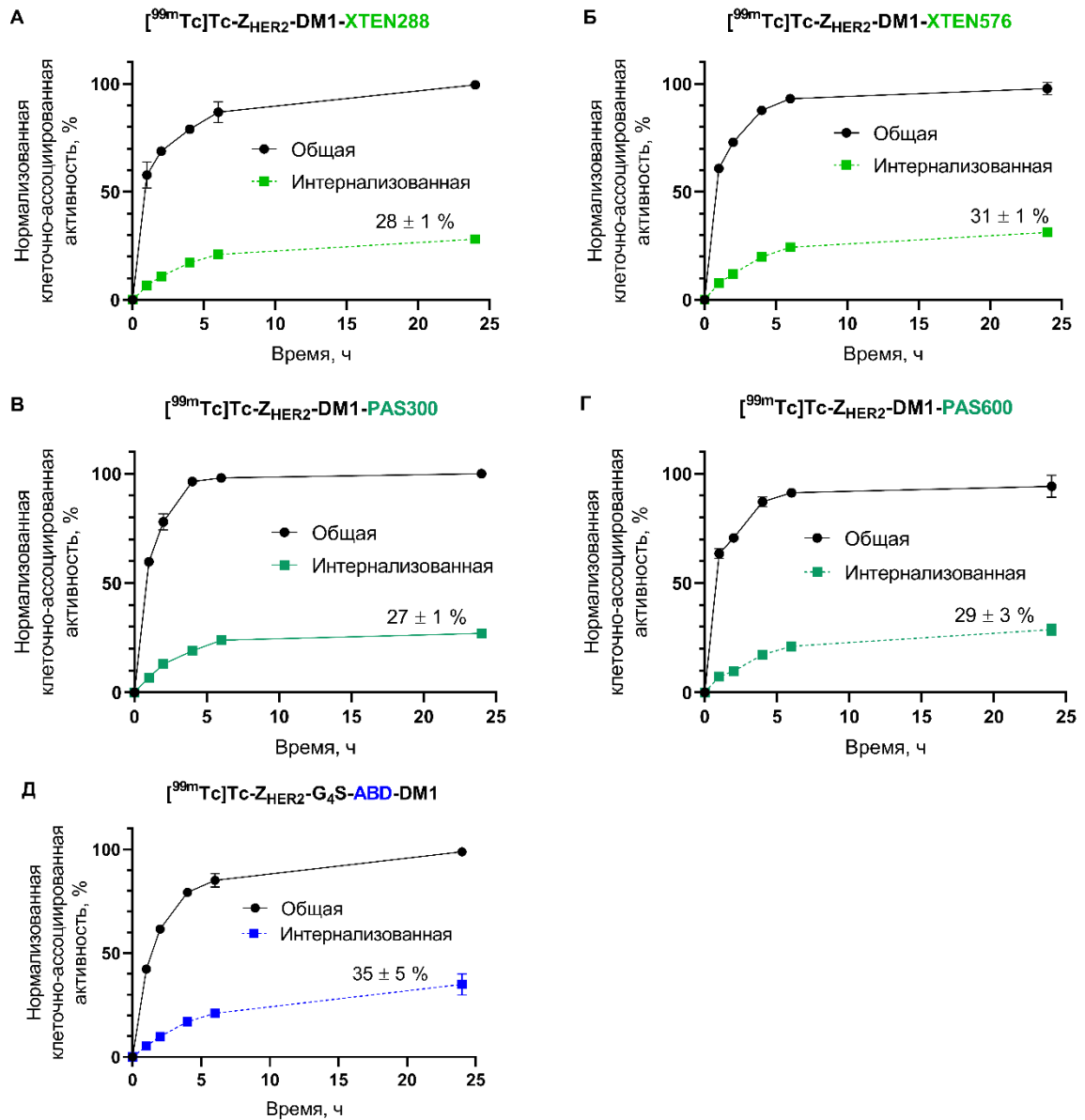


Рисунок 23 – Результаты оценки интернализации группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, в HER2-экспрессирующей клеточной линии SKOV3 ( $M \pm SD$ )

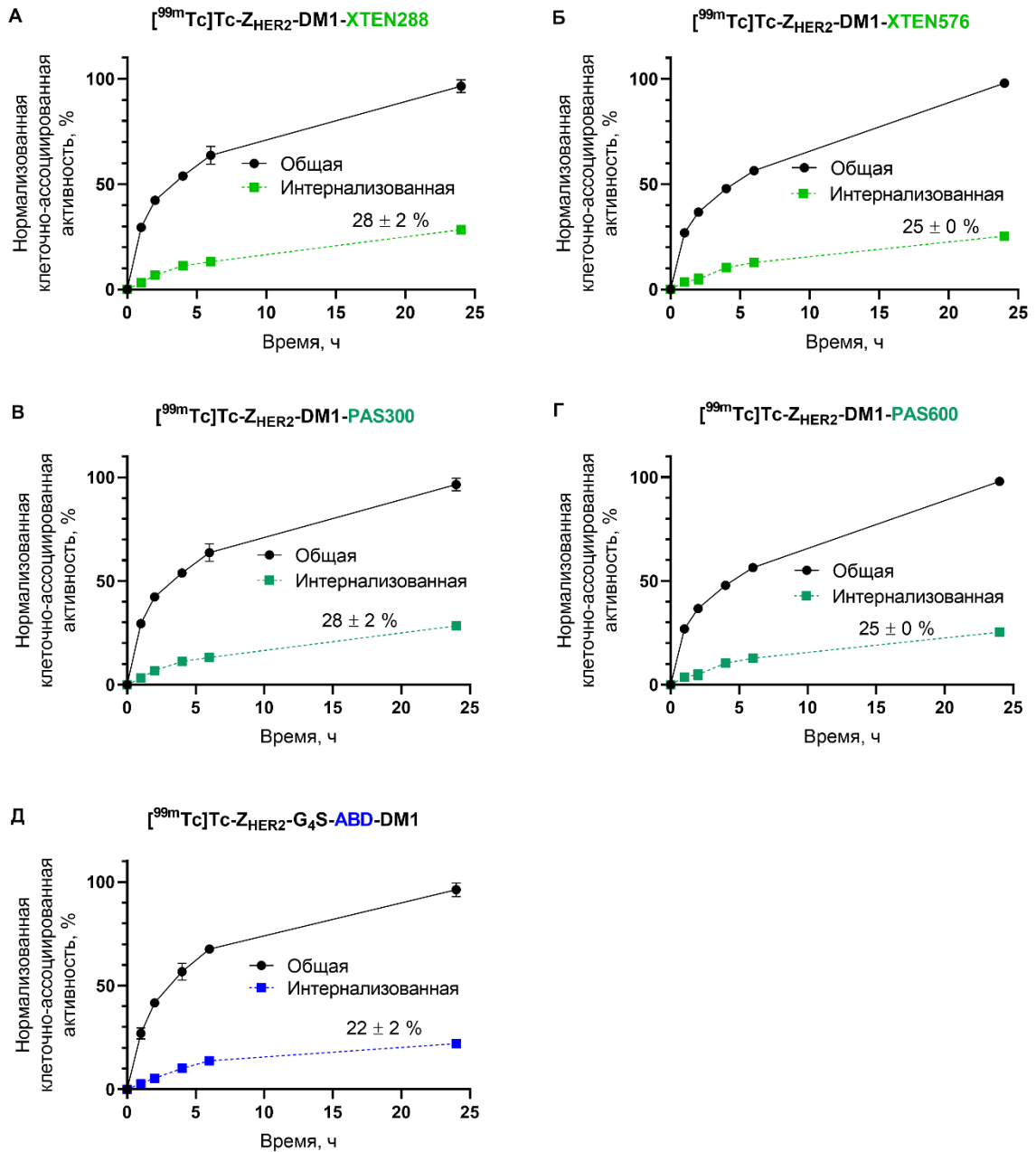


Рисунок 24 – Результаты оценки интернализации группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, в HER2-экспрессирующей клеточной линии BT474 ( $M \pm SD$ )

Результаты оценки интернализации группы конъюгатов с конъюгатов с различными цитотоксическими агентами представлены на рисунке 25. Интернализированные фракции через 24 ч в клетках SKOV3 для  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-ABD-MMAE}$ ,  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-ABD-MMAF}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-ABD-DM1}$

составили  $37 \pm 2 \%$ ,  $36 \pm 2 \%$ ,  $40 \pm 0 \%$ , соответственно. Интернализированная фракция была ниже в клетках BT474 по сравнению со SKOV3 и составила через 24 часа инкубации  $27 \pm 2 \%$ ,  $27 \pm 3 \%$ ,  $31 \pm 2 \%$  для конъюгатов  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-ABD-MMAE}$ ,  $\text{Z}_{\text{HER2}}\text{-ABD-MMAF}$  и  $\text{Z}_{\text{HER2}}\text{-ABD-DM1}$ , соответственно. Изменение цитотоксического агента не оказало существенного влияния на характер связывания и интернализации.

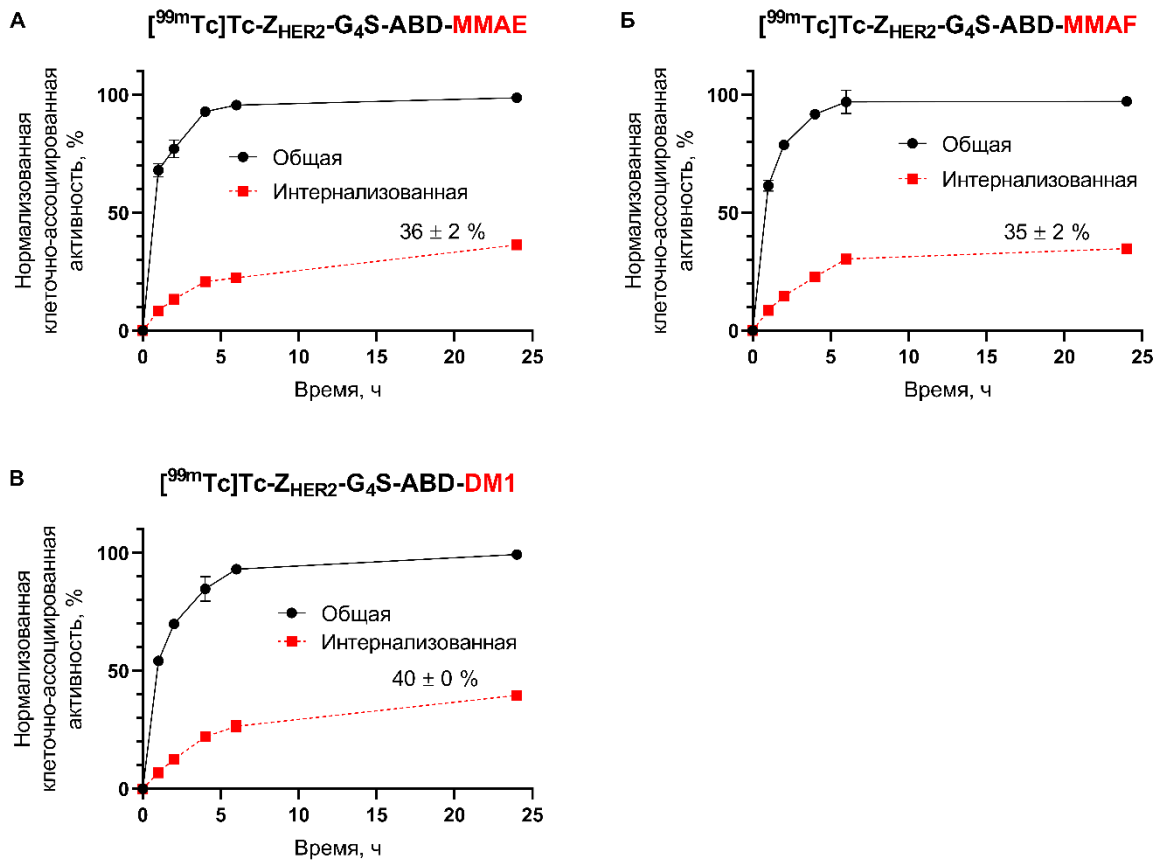


Рисунок 25 – Результаты оценки интернализации группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами в HER2-экспрессирующей клеточной линии SKOV3 ( $M \pm SD$ )

Результаты оценки интернализации группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров представлены на рисунках 26–27. Состав линкера не оказал влияния на скорость интернализации конъюгатов клетками BT474, но уровень интернализированной активности клетками SKOV3 для

конъюгата с линкером  $(G_3S)_3$  была значимо выше ( $42 \pm 2\%$  от общей клеточно-ассоциированной активности через 24 часа инкубации), по сравнению с конъюгатами с линкерами  $(S_3G)_3$  и  $G_4S$  ( $23 \pm 1\%$  и  $22 \pm 1\%$  от общей клеточно-ассоциированной активности через 24 часа инкубации, соответственно).

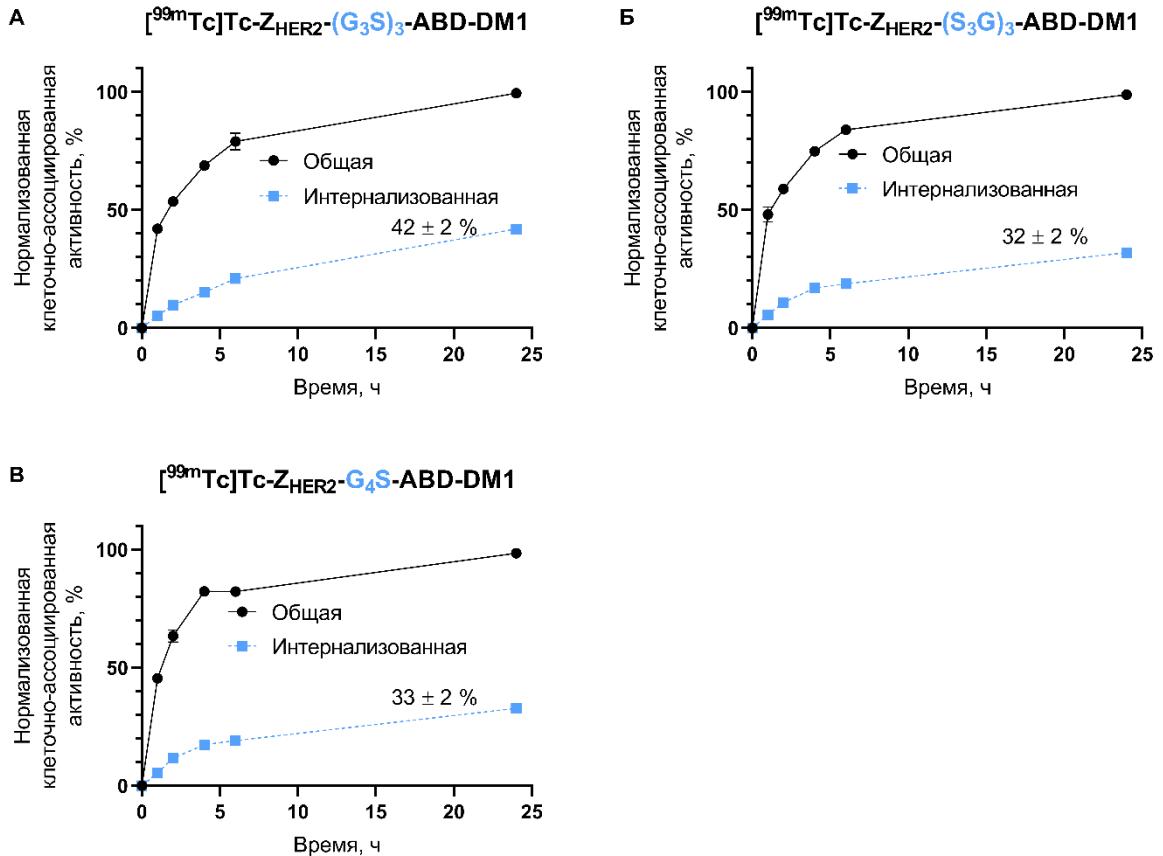


Рисунок 26 – Результаты оценки интернализации группы конъюгатов с различными междоменными линкерами в HER2-экспрессирующей клеточной линии SKOV3 ( $M \pm SD$ )

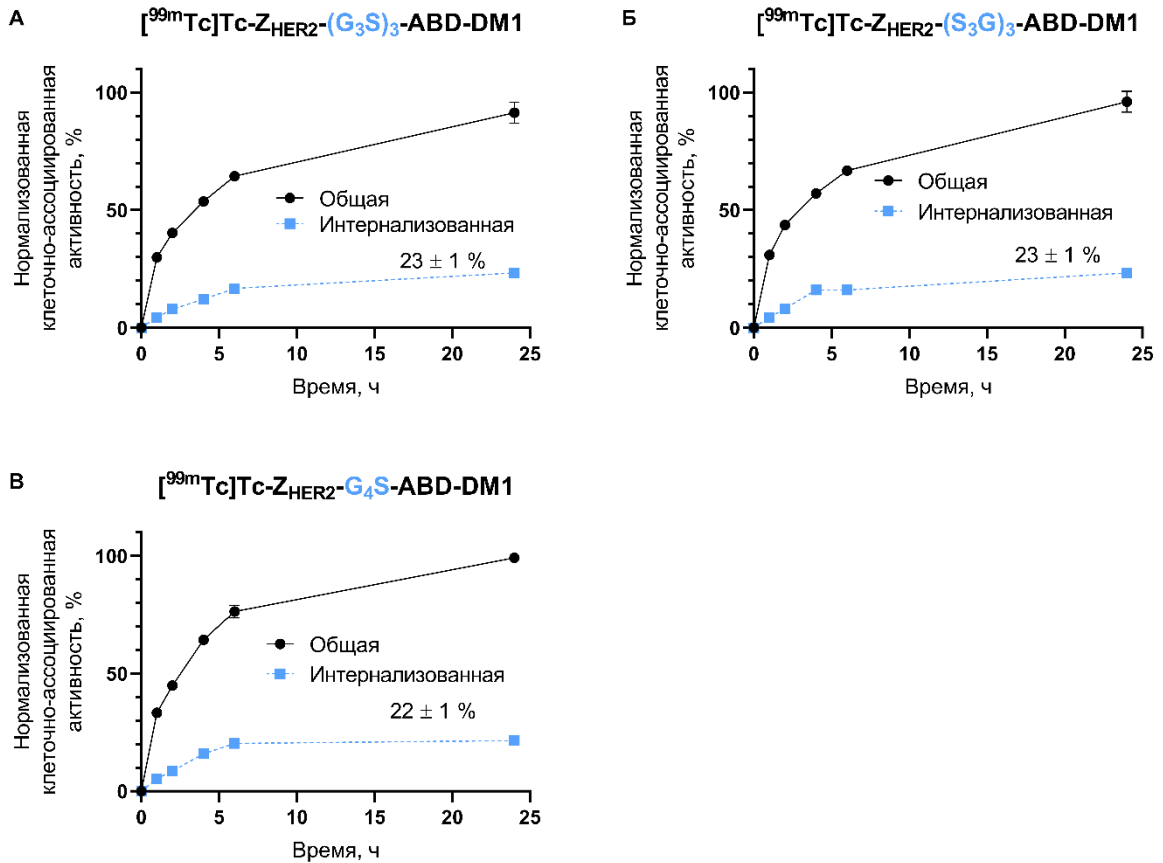


Рисунок 27 – Результаты оценки интернализации группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров в HER2-экспрессирующей клеточной линии BT474 ( $M \pm SD$ )

### 3.4 Результаты оценки функциональной пригодности, биораспределения и фармакокинетики таргетных терапевтических конъюгатов *in vivo*

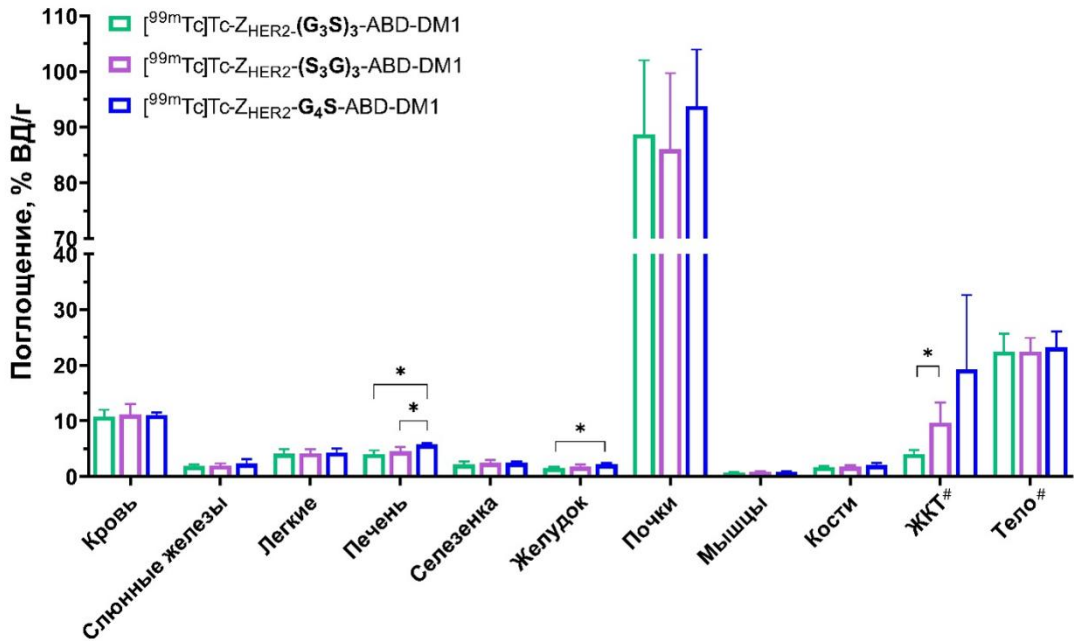
#### 3.4.1 Изучение *in vivo* группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров в исследованиях на здоровых мышах линии NMRI

Для проведения исследования 36 самкам мышей линии NMRI внутривенно вводили  $^{99m}\text{Tc}$ -меченные конъюгаты  $\text{Z}_{\text{HER2}}-(\text{G}_3\text{S})_3\text{-ABD-DM1}$ ,

$Z_{HER2}-(S_3G)_3$ -ABD-DM1,  $Z_{HER2}-G_4S$ -ABD-DM1 в дозе 6 мкг (400 пмоль) вещества на мышь. Поглощение активности в органах и тканях измеряли через 4, 24 и 48 часов после инъекции.

Результаты эксперимента представлены на рисунках 30–31 и в таблице Б.1 (приложение Б). Для исследуемой группы конъюгатов во всех трех временных точках наибольшее накопление активности наблюдалось в почках, которое составило 86–94 % ВД/г через 4 часа и 36–44 % через 24 часа после инъекции, без значимых различий ( $p > 0,05$ ) между конъюгатами в данные временные точки. С течением времени почечное поглощение снижалось, при этом через 48 часов после инъекции накопление было несколько, но значительно ниже ( $p < 0,05$ ) для конъюгата с линкером  $G_4S$  ( $19 \pm 1$  % ВД/г) по сравнению с конъюгатом с линкером  $(S_3G)_3$  ( $24 \pm 2$  % ВД/г). Накопление в печени было относительно низким (ниже 6 % ВД/г через 4 часа после инъекции). В совокупности данные демонстрируют выведение исследуемых конъюгатов преимущественно через мочевыделительную систему.

Основной путь элиминации трастузумаб эмтанзина реализуется за счет гепатобилиарной системы с последующим выведением через желудочно-кишечный тракт. По результатам терапии трастузумабом эмтанзином вторым часто сообщаемым нежелательным явлением 3 степени является повышение уровня печеночных ферментов, включая аспартат- и аланинаминотрансферазы [21]. Предполагая, что почки более устойчивы к цитотоксическому эффекту DM1, сниженное накопление в печени исследуемых конъюгатов благоприятно.



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$   
(one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 28 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров в мышцах NMRI через 4 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )

Для всех конъюгатов наблюдалось длительное удержание в крови и составило 10–13 % ВД/г через 4 часа после инъекции с постепенным снижением до 1,5–3 % ВД/г через 48 часов после инъекции. На рисунке 29 представлена кинетика накопления активности в крови, вынесенная на график как функция от времени для расчета периода полувыведения из плазмы крови ( $T_{1/2}$ ). Не наблюдалось значимых различий между конъюгатами через 4 и 24 часа после инъекции ( $p > 0,05$ ). Через 48 часов удержание в крови конъюгата Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1 было значимо ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с конъюгатами с линкерами (G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub> и (S<sub>3</sub>G)<sub>3</sub>. Однако, наиболее коротким периодом полувыведения из крови характеризовался Z<sub>HER2:2891</sub>-(S<sub>3</sub>G)<sub>3</sub>-ABD-DM1 ( $T_{1/2} = 9,2$  ч), по сравнению с конъюгатами с линкерами (G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub> ( $T_{1/2} = 10,3$  ч) и G<sub>4</sub>S ( $T_{1/2} = 10,7$  ч).

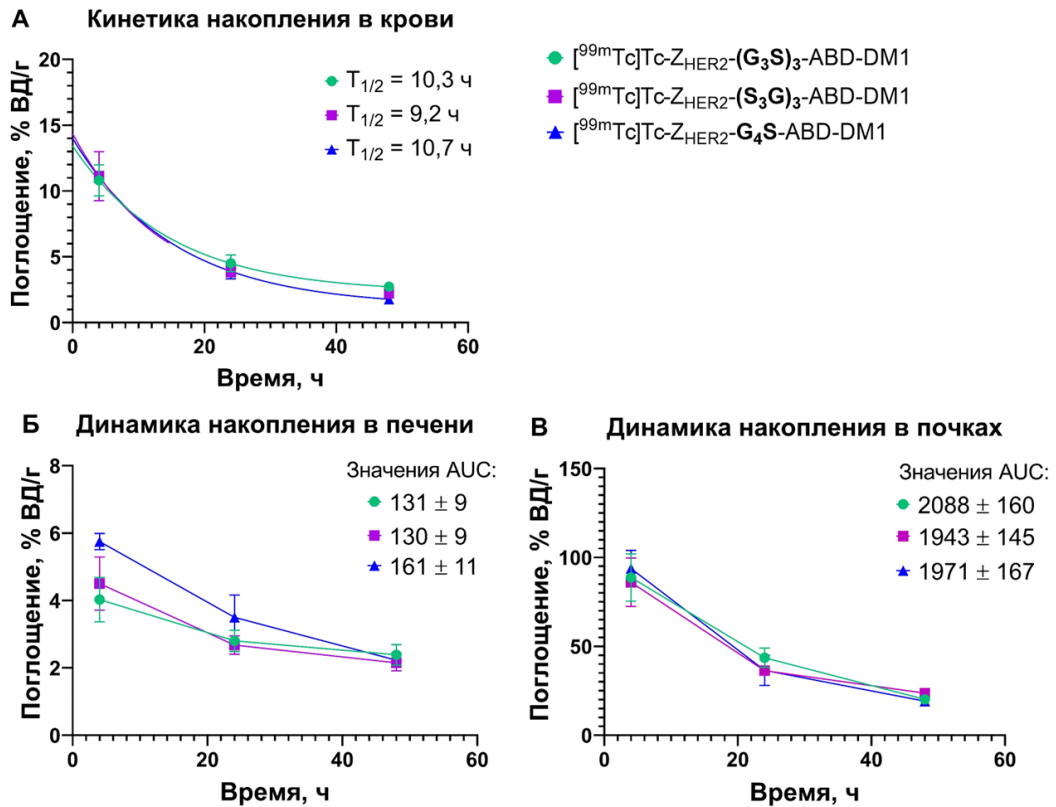


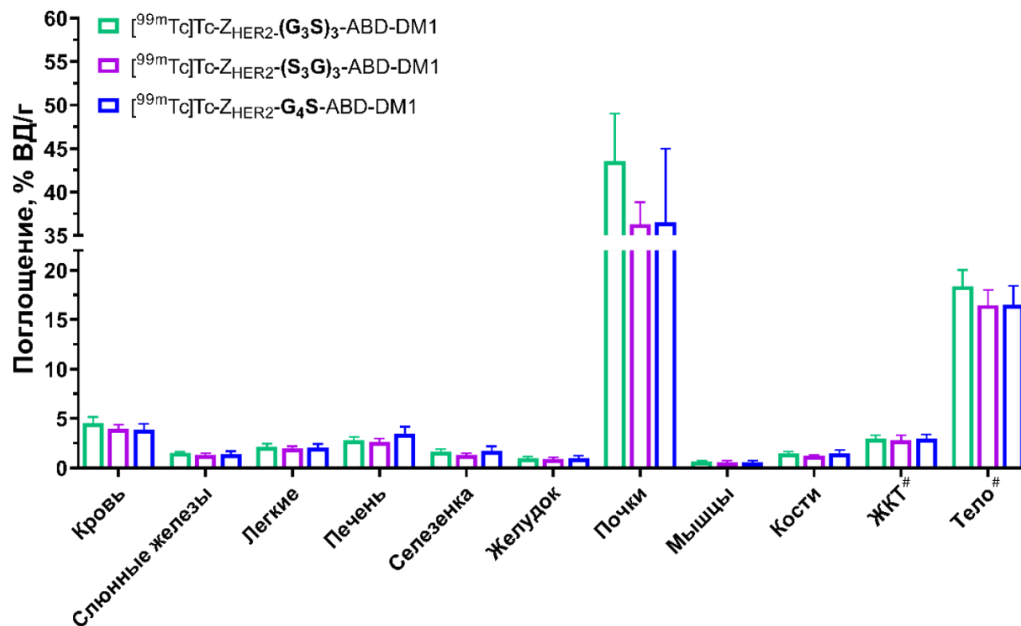
Рисунок 29 – Кинетика накопления активности в крови, представленная как функция от времени (А) и динамика поглощения активности в печени (Б) и почках (В), представленные как площадь под кривой «поглощение-время» (AUC) для группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров ( $M \pm SD$ )

Для сравнительной оценки накопленной активности в печени была рассчитана площадь под кривой (AUC), представленная на рисунке 29(Б). Значения AUC значимо ниже для конъюгатов с линкерами  $(G_3S)_3$  (в 1,27 раза) и  $(S_3G)_3$  (в 1,25 раза), по сравнению с конъюгатом с линкером  $G_4S$ . Прямое параллельное сравнение конъюгатов с различным составом междоменных линкеров показало, что использование линкеров  $(S_3G)_3$  и  $(G_3S)_3$  привело к значимому снижению ( $p < 0,05$ ) поглощения печенью по сравнению с использованием линкера  $G_4S$ .

Более ранние исследования *in vivo* с молекулами аффибоди и конъюгатами аффибоди и цитотоксических агентов продемонстрировали, что поглощение печенью коррелирует с наличием липофильных участков на

поверхностях этих белков и может быть нейтрализовано включением гидрофильных аминокислот [107, 121]. Вероятно, именно повышенное содержание полярных аминокислотных остатков серина в линкерах  $(S_3G)_3$  и  $(G_3S)_3$  вызывает снижение поглощение печенью новых конструкций.

Через 4 часа после инъекции наблюдались несколько, но значимо ( $p < 0,05$ ) сниженные уровни поглощения конъюгата с линкером  $(G_3S)_3$  в желудке, по сравнению с конъюгатом с линкером  $G_4S$ , а также сниженные уровни поглощения в остатках ЖКТ для конъюгата с линкером  $(G_3S)_3$  по сравнению с конъюгатом с линкером  $G_4S$ . Через 24 часа после инъекции уровни поглощения в органах и тканях не имели значимых различий ( $p > 0,05$ ) среди всей группы конъюгатов.



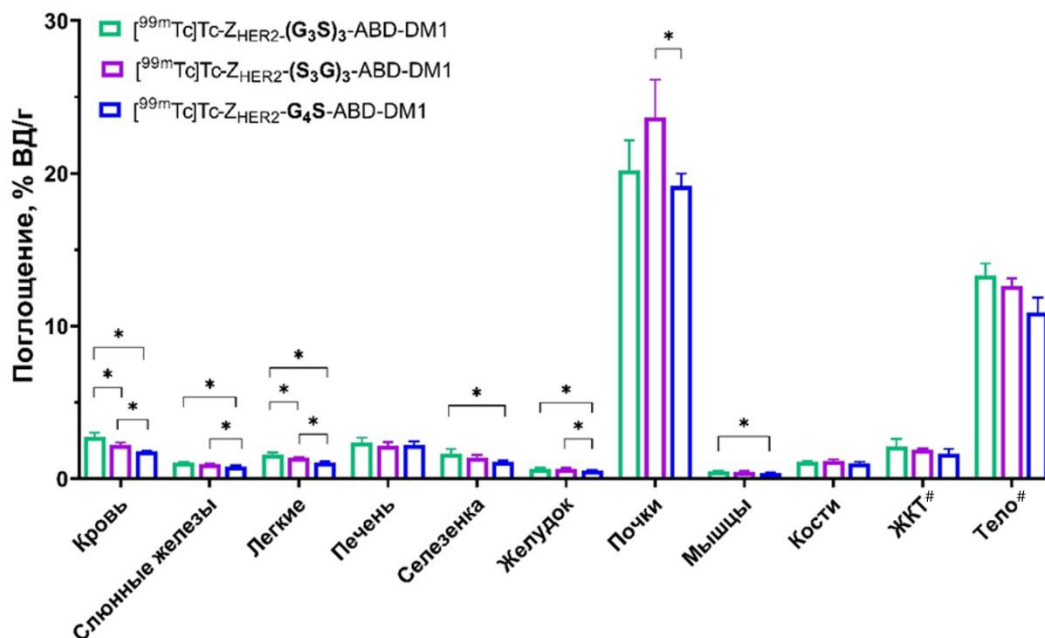
(one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 30 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров в мышцах NMRI через 24 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )

Через 48 часов после инъекции наблюдалось значимое ( $p < 0,05$ ) снижение поглощения конъюгата с линкером  $G_4S$  в легких, по сравнению с

конъюгатами с линкерами  $(G_3S)_3$  и  $(S_3G)_3$ , а также значимое ( $p < 0,05$ ) снижение поглощение конъюгата с линкером  $G_4S$  в селезенке и мышцах, по сравнению с конъюгатом с линкером  $(G_3S)_3$ .



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 31 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров в мышцах NMRI через 48 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )

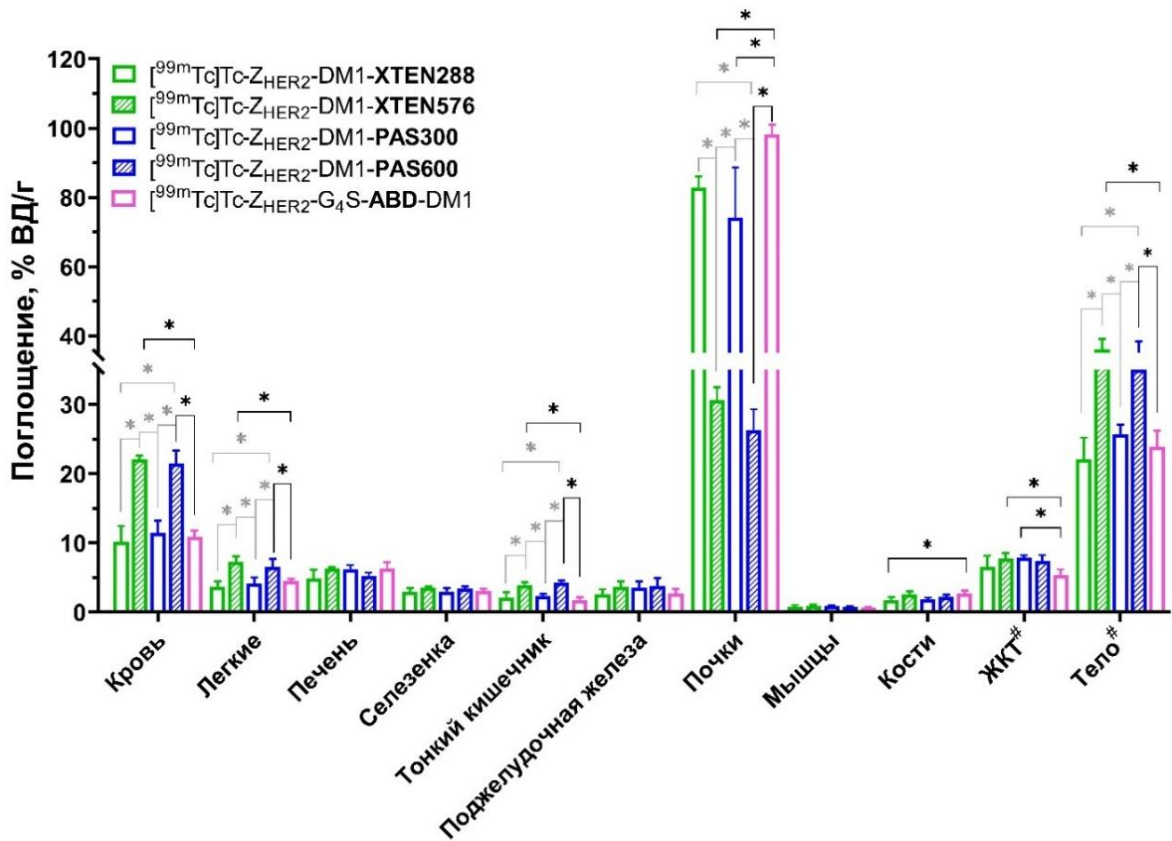
Состав, длина и заряд междоменных линкеров оказывают явное влияние на свойства исследуемых конъюгатов. Конъюгат с коротким линкером из 5 аминокислот,  $G_4S$ , проявляет более высокую целенаправленную цитотоксичность в исследованиях *in vitro*. Однако, более длинные гидрофильные линкеры из 12 аминокислот с высоким содержанием серина обеспечивают статистически значимое снижение поглощения печенью в исследованиях *in vivo*.

### 3.4.2 Изучение *in vivo* группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающих период полувыведения

Для оценки биораспределения и фармакокинетических свойств группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения 60 самкам мышей стока CD-1 внутривенно вводили  $^{99m}\text{Tc}$ -меченные конъюгаты  $Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN288}$ ,  $Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN576}$ ,  $Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS300}$ ,  $Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS600}$  и  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$  в дозе 200 пмоль вещества на мыш. Поглощение активности в органах и тканях измеряли через 4, 24 и 48 ч после инъекции.

Результаты эксперимента представлены на рисунках 32–35 и в таблице Б.2 (приложение Б). Через 4 ч после инъекции (рисунок 32) уровни накопления активности в крови конъюгатов, содержащих полипептиды с большей длиной аминокислотной цепи и большей молекулярной массой (XTEN576 и PAS600), определены значимо выше ( $p < 0,05$ ), по сравнению с конъюгатами, включающих полипептиды XTEN288 и PAS300, а также ABD. При этом уровень накопления конъюгата, содержащего ABD, достоверно не отличался ( $p > 0,05$ ) по сравнению с уровнем накопления конъюгатов, слитыми с XTEN288 и PAS300. Аналогичная картина биораспределения конъюгатов отмечена в тканях легких и тонкого кишечника. Уровень накопления в костях определен значимо ниже ( $p < 0,05$ ) для  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-}Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN288}$ , по сравнению с  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-}Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ .

Уровни поглощения активности в почках через 4 часа после инъекции установлены достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) для конъюгатов с полипептидами с большей молекулярной массой (XTEN576 и PAS600), по сравнению с конъюгатами, слитыми с полипептидами XTEN288 и PAS300, а также с ABD. Конъюгаты  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-}Z_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN288}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-}Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$  показали наибольшие уровни поглощения в почках.



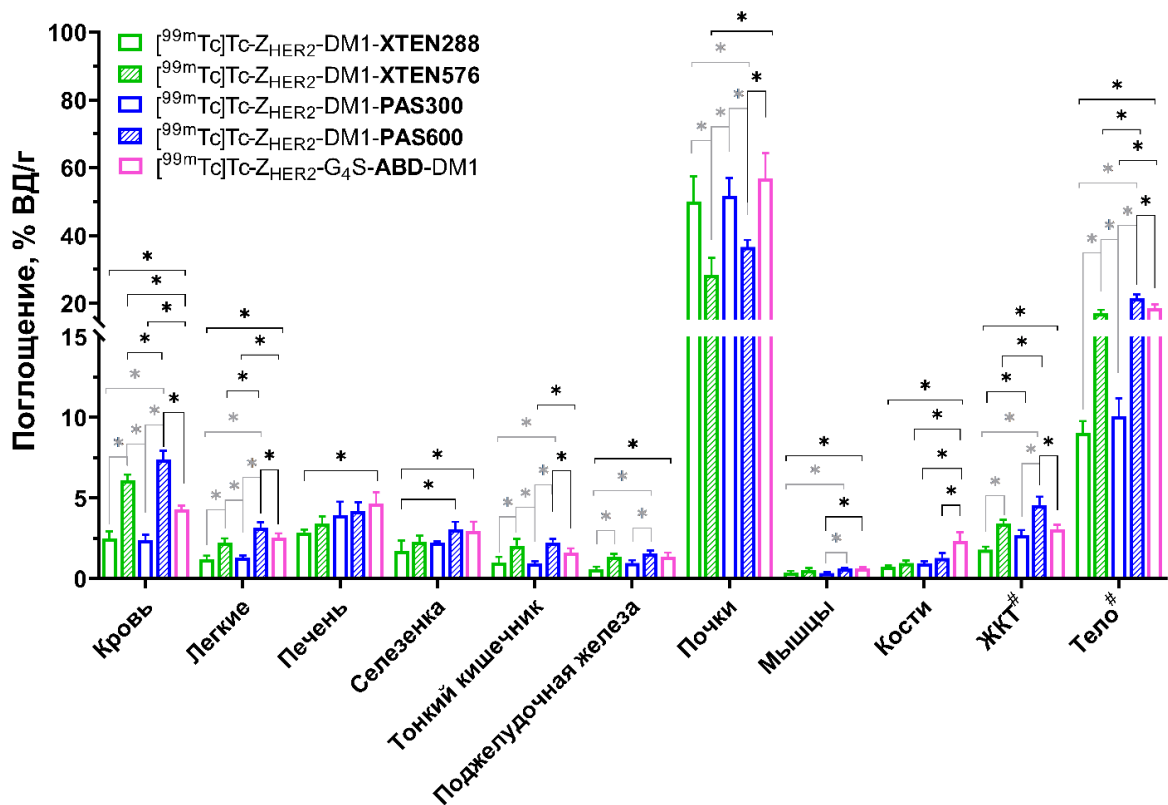
\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$   
(one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)  
# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 32 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения в мышах CD1 через 4 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )

Спустя 24 ч после инъекции (рисунок 33), аналогично данным, полученным через 4 ч, уровни накопления в крови  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN576}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS600}$  определены значимо ( $p < 0,05$ ) выше, по сравнению с конъюгатами, содержащими полипептиды XTEN288, PAS300 и ABD. Однако уровень накопления  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$  установлен достоверно более высокий ( $p < 0,05$ ) в сравнении с конъюгатами, слитыми с XTEN288 и PAS300.

Уровни почечного поглощения  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$  через 24 ч после инъекции определены достоверно ( $p < 0,05$ ) выше уровней накопления

конъюгатов, содержащих XTEN576 и PAS600, и значимо не отличались ( $p > 0,05$ ) от накопления конъюгатов с меньшей молекулярной массой, XTEN288 и PAS300. Разница молекулярных масс конъюгатов также была отражена в различиях в накоплении в тканях легких, тонкого кишечника, поджелудочной железы, остатков органов ЖКТ и тела. Конъюгат [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1 показал значимо ( $p < 0,05$ ) более высокое накопление в тканях печени, селезенки, поджелудочной железы (в сравнении с XTEN288), в костях (в сравнении со всеми конъюгатами группы).

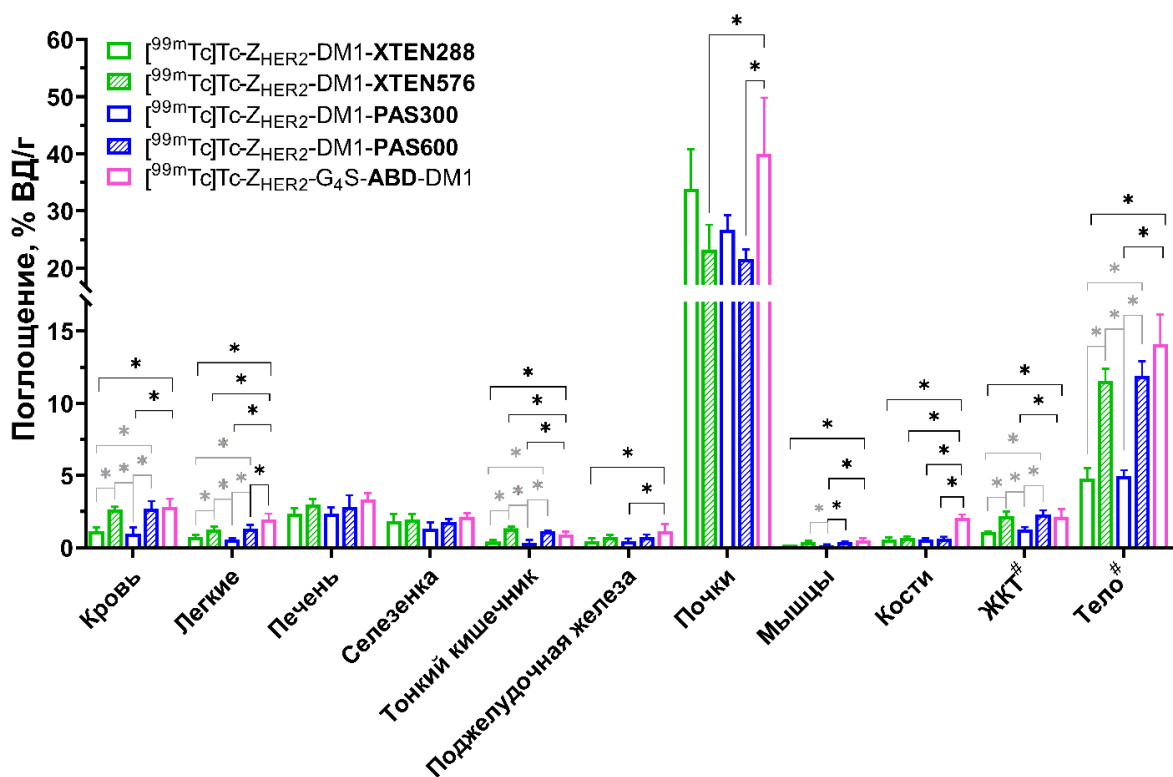


\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 33 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения в мышцах CD1 через 24 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )

Спустя 48 ч после введения (рисунок 34) определено снижение удержания в системном кровотоке для всех исследуемых конъюгатов группы, при этом сохранялась прямая зависимость поглощения активности от молекулярной массы молекул. Однако конъюгат  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ , в отличие от данных предыдущих временных точек, показал схожие ( $p > 0,05$ ) уровни накопления с более крупными конъюгатами, содержащими полипептиды XTEN576 и PAS600, и значимо ( $p < 0,05$ ) превышал накопление  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN288}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS300}$ .



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 34 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения в мышцах CD1 через 48 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )

Кинетика удержания активности в крови представлена на рисунке 35А. Все конъюгаты группы имели более длительное удержание в крови в

сравнении с исходной молекулой аффибоди  $Z_{HER2:2891}$ , которая ввиду малого размера быстро выводится из кровотока, и через 30 минут после введения присутствует в крови в концентрации  $2,0 \pm 0,2$  % ВД/г [180]. Конъюгаты  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-PAS300}$  и  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-XTEN288}$  имели наименьшие периоды полувыведения (7,3 и 7,6 часов, соответственно), за ними следовали  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-XTEN576}$  (8,7 часов) и  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-G_4S-ABD-DM1}$  (9,0 часов). Наиболее длинный период полувыведения (11,6 часа) наблюдался для  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-PAS600}$ . Поглощение в печени было относительно низким для всех конъюгатов данной группы во все исследованные временные точки. При этом значения площади под кривой (AUC) для конъюгатов с полипептидами PAS и XTEN были ниже или аналогичны значению AUC для конъюгата  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-G_4S-ABD-DM1}$  (рисунок 35Б, 35В).

Поглощение в нормальных органах и тканях соответствовало кинетике крови и снижалось с течением времени (рисунки 33–35). Исключение составило накопление конъюгата  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-G_4S-ABD-DM1}$  в костях, которое оставалось относительно стабильным в течение 48 часов эксперимента.

Наивысшие показатели поглощения во все временные точки были определены в почках, что характерно для молекул аффибоди и также указывает на преобладающий почечный клиренс всех исследуемых конъюгатов группы. Однако конъюгаты с двухкратно увеличенной молекулярной массой,  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-XTEN576}$  и  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-PAS600}$ , показали в два раза меньшие значения почечных AUC по сравнению с их меньшими вариантами, содержащих в своей конструкции полипептиды XTEN288 и PAS300. При этом значения почечных AUC для  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-XTEN288}$  и  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-PAS300}$  были сопоставимы со значением AUC для  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-ABD-DM1}$ . Конъюгаты  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-XTEN576}$  и  $[^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2-DM1-PAS600}$  показали более длинные

периоды полувыведения и, соответственно, сниженное почечное накопление по сравнению с остальными конъюгатами группы через 4 часа после инъекции. Однако через 24 и 48 часов после инъекции почечное накопление соответствовало накоплению [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-**ABD-DM1**.

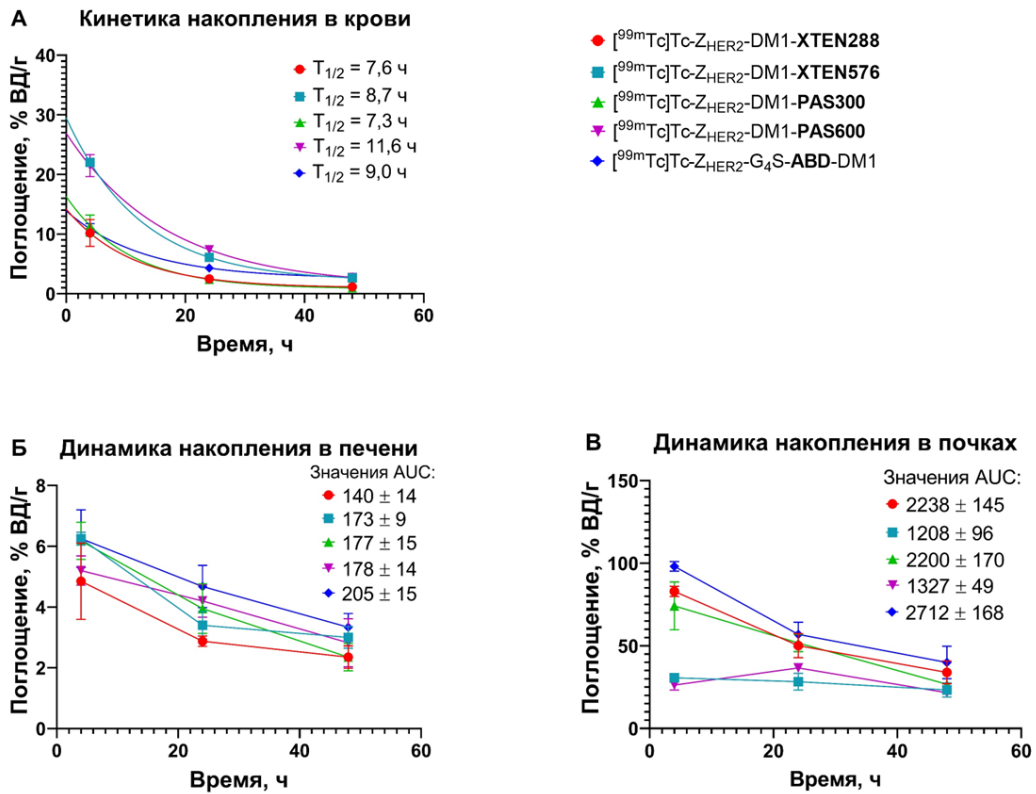
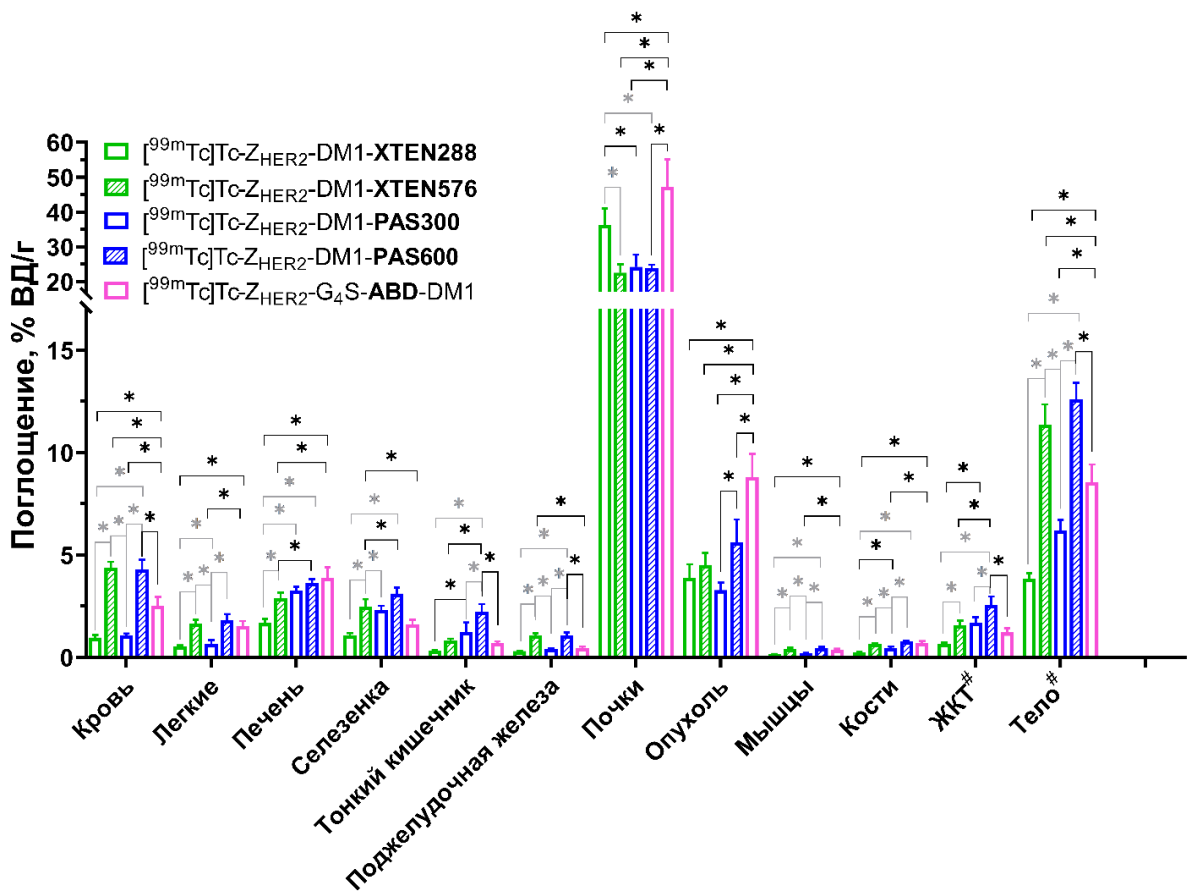


Рисунок 35 – Кинетика накопления активности в крови, представленная как функция от времени (А), и динамика накопления активности в печени (Б) и почках (В), представленные как площадь под кривой «поглощение-время» (AUC), в мышях CD1 для группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения ( $M \pm SD$ )

Для оценки целевых свойств *in vivo* группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения самкам мышей линии BALB/c nu/nu, несущим HER2-экспрессирующие ксенографты аденокарциномы яичника SKOV3 и самкам мышей линии BALB/c nu/nu, несущим ксенографты HER2-негативной клеточной линии лимфомы Биркитт Ramos, внутривенно вводили  $^{99m}\text{Tc}$ -меченные Z<sub>HER2</sub>-DM1-

**XTEN288**, **Z<sub>HER2</sub>-DM1-XTEN576**, **Z<sub>HER2</sub>-DM1-PAS300**, **Z<sub>HER2</sub>-DM1-PAS600** и **Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1** в дозе 200 пмоль вещества на мышь. Поглощение активности в органах, тканях и опухолях измеряли через 48 часов после инъекции. Результаты сравнительного биораспределения изучаемой группы конъюгатов в мышах BALB/c nu/nu с HER2-экспрессирующими ксенотрансплантатами SKOV3 представлены на рисунке 36 и в таблице Б.3 (приложение Б).



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$   
(one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

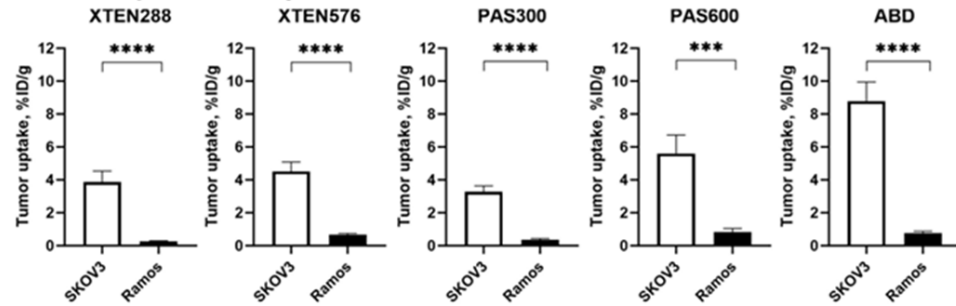
# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 36 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения в мышах BALB/c nu/nu с HER2-экспрессирующими ксенотрансплантатами SKOV3 через 48 ч после инъекции (M ± SD)

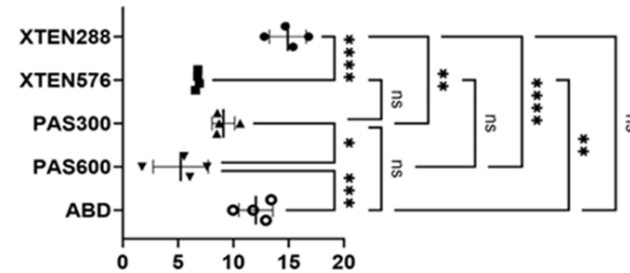
Оценка таргетных свойств *in vivo* исследуемой группы конъюгатов у мышей BALB/c nu/nu с ксенотрансплантатами SKOV3 в сравнении с ксенографтами Ramos представлена на рисунке 37. Все конъюгаты группы показали специфичное накопление *in vivo* в HER2-экспрессирующих ксенографтах SKOV3 (рисунок 37А). Значения опухолевого поглощения в ксенотрансплантатах SKOV3 составили  $3,86 \pm 0,68$  % ВД/г для [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-XTEN288}}$ ,  $4,51 \pm 0,57$  % ВД/г для [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-XTEN576}}$ ,  $3,27 \pm 0,36$  % ВД/г для [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-PAS300}}$  и  $5,6 \pm 1,13$  % ВД/г [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-PAS600}}$  (рисунок 37Б). Средние значения опухолевого поглощения в ксенотрансплантатах Ramos для конъюгатов с более низким гидродинамическим радиусом, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-XTEN288}}$  и [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-PAS300}}$ , составили ниже 0,5 % ВД/г, для конъюгатов [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-XTEN576}}$ , [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-PAS600}}$  определены ниже 2 % ВД/г, и выявлены около 1 % ВД/г для конъюгата [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-ABD-DM1}}$ .

Для сравнения специфичности воздействия на опухоль для конъюгатов группы был рассчитан индекс поглощения специфичности опухоли путем деления значения поглощения (% ВД/г) конъюгата в ксенотрансплантатах SKOV3, экспрессирующих HER2, на значение его поглощения в HER2-отрицательных ксенотрансплантатах Ramos (рисунок 37Б). Для конъюгатов [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-XTEN288}}$  и [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-ABD-DM1}}$  были определены одинаковые индексы специфичности, при этом наиболее высокие среди группы. Несколько меньшие индексы были определены для конъюгатов [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-PAS300}}$  и [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-XTEN576}}$ . Конъюгат [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc- $Z_{\text{HER2-DM1-PAS600}}$  показал наиболее низкий индекс.

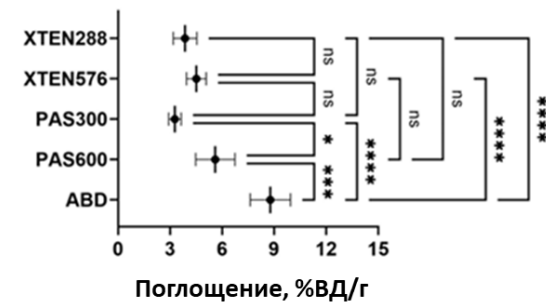
### А Специфичность опухолевого накопления *in vivo*



### Б Индекс специфичности опухолевого поглощения



### В Сравнение опухолевого поглощения (SKOV3)

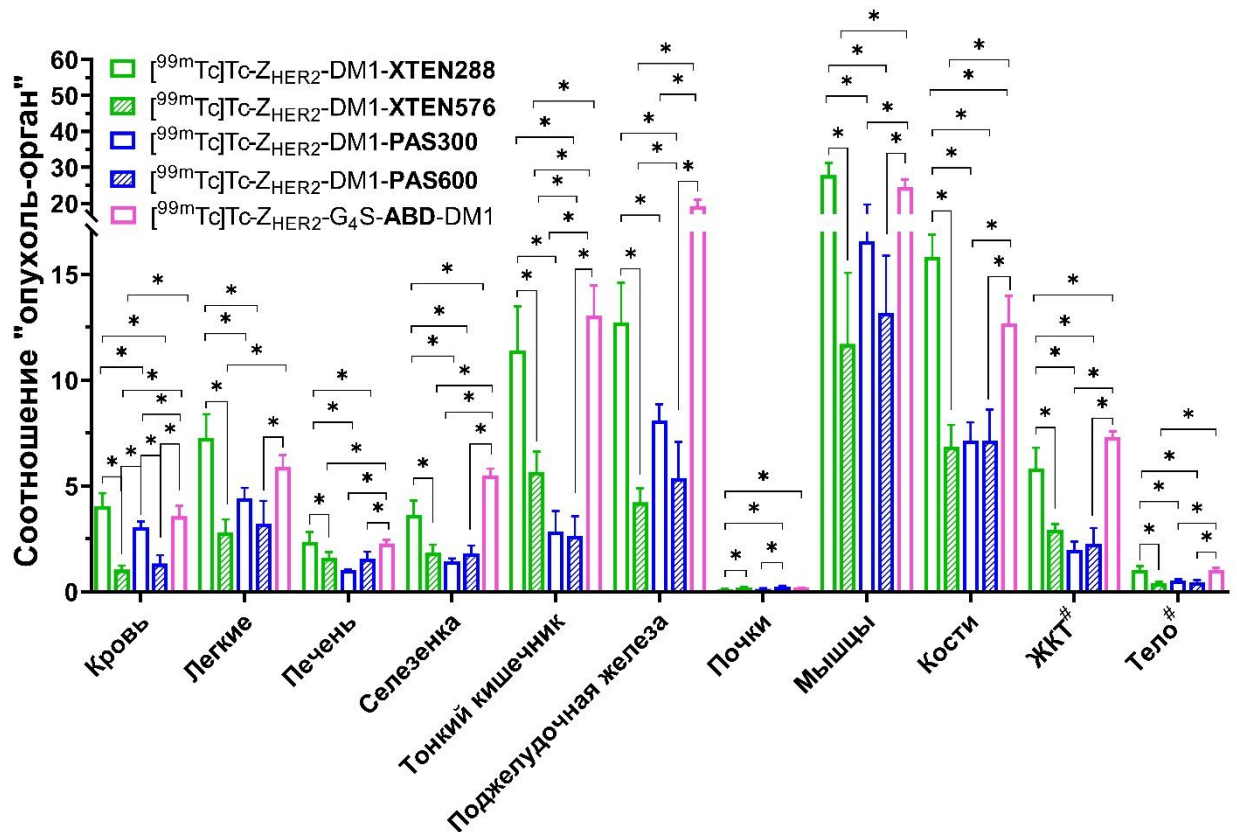


\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$ , \*\* – при  $p < 0,05$ , \*\*\* – при  $p < 0,001$ , \*\*\*\* – при  $p < 0,0001$ , ns – незначимые различия (one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

Рисунок 37 – Оценка таргетных свойств *in vivo* группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения, у мышей BALB/c nu/nu с ксенотрансплантатами SKOV3 и Ramos через 48 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )

На основании данных биораспределения были рассчитаны соотношения «опухоль-орган» для изучаемой группы конъюгатов в мышях BALB/c nu/nu с HER2-экспрессирующими ксенотрансплантатами SKOV3 через 48 ч после инъекции (рисунок 37). Для большинства органов наибольшие показатели «опухоль-орган» были определены для конъюгатов [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-

**XTEN288** и  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ , без значимых отличий между друг другом ( $p > 0,05$ ), за исключением селезенки и остатков органов ЖКТ, где соотношение «опухоль-орган» значимо превышало ( $p < 0,05$ ) для конъюгата с ABD по сравнению с конъюгатом с XTEN288. Конъюгат  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-}Z_{HER2}\text{-ABD-DM1}$  показал наилучшие соотношения «опухоль-орган».



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 37 – Соотношение «опухоль-орган» для группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения в мышцах BALB/c nu/nu с HER2-экспрессирующими ксенотрансплантатами SKOV3 через 48 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )

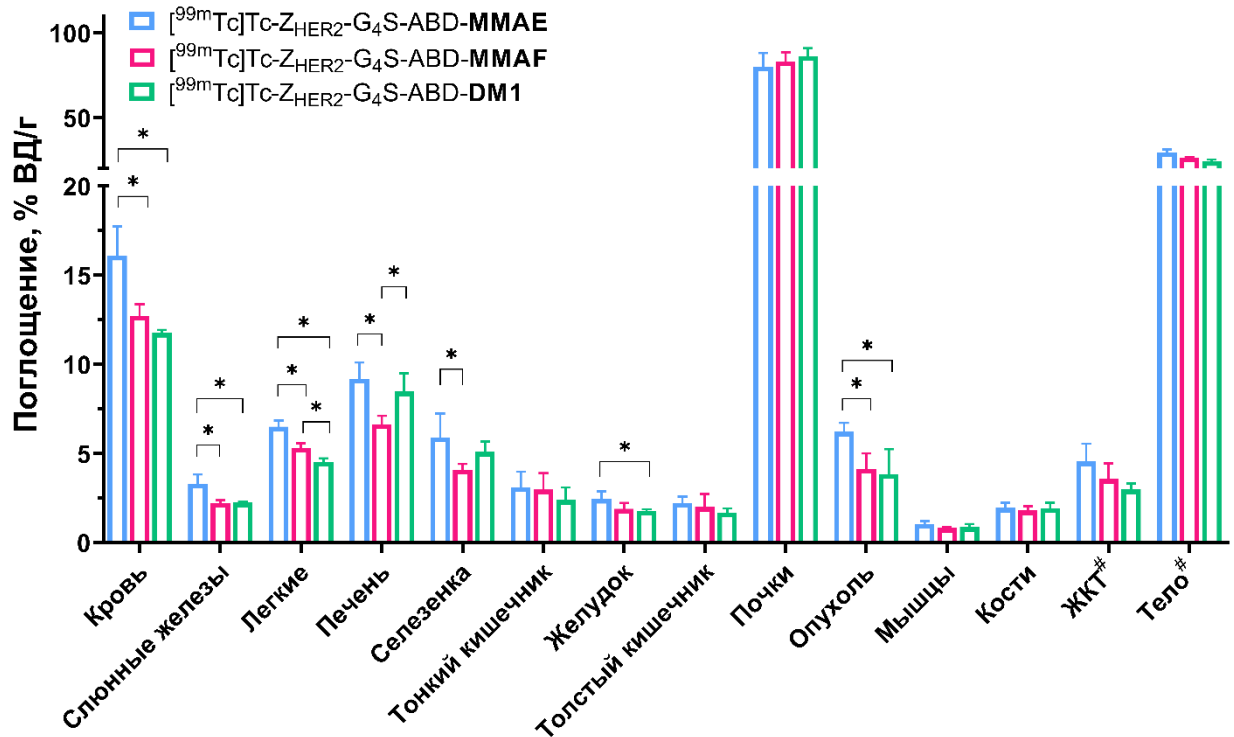
### 3.4.3 Изучение *in vivo* группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами

Для проведения исследования 36 самкам мышей линии BALB/c nu/nu, несущим HER2-экспрессирующие ксенографты опухоли рака яичника SKOV3, внутривенно вводили  $^{99m}\text{Tc}$ -меченные конъюгаты  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ ,  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$ ,  $Z_{\text{HER2:2891}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAE}$  в дозе 6 мкг (400 пмоль) вещества на мыш. Поглощение активности в органах и тканях измеряли через 4, 24 и 48 часов после инъекции.

Результаты исследования представлены на рисунках 38–43 и в таблице Б.4. Во всех трех временных точках наибольшее накопление активности для всех конъюгатов наблюдалось в почках (в диапазоне от 80 до 90 % ВД/г), накопление в печени были относительно низким (ниже 10 % ВД/г), что предполагает выведение исследуемых конъюгатов через мочевыделительную систему.

Для всех конъюгатов наблюдалось длительное удержание в крови с тенденцией к снижению в более поздние временные точки (рисунок 39А). Наибольшая разница в накоплении активности в крови наблюдалась через 4 часа после инъекции, где поглощение было значимо выше ( $p < 0,05$ ) для конъюгата с цитотоксическим агентом MMAE ( $16 \pm 2$  % ВД/г), по сравнению с конъюгатами с цитотоксинами DM1 ( $13 \pm 1$  % ВД/г) и MMAF ( $11,8 \pm 0,2$  % ВД/г). Через 24 часа после инъекции удержание в крови конъюгатов с цитотоксинами MMAE ( $7 \pm 1$  % ВД/г) и MMAF ( $7 \pm 1$  % ВД/г) было несколько выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с конъюгатом с цитотоксином DM1 ( $4,9 \pm 0,4$  % ВД/г). Через 48 часов после инъекции также наблюдалась небольшая, но значимая разница ( $p < 0,05$ ) в удержании в крови для конъюгатов с цитотоксинами MMAE ( $4,5 \pm 0,2$  % ВД/г), DM1 ( $3,9 \pm 0,2$  % ВД/г) и MMAF

( $2,9 \pm 0,3$  % ВД/г). Активность в большинстве нормальных органов снижалась с течением времени.



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 38 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами в мышцах линии BALB/c nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3, через 4 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )

Сравнение поглощения печенью (рисунок 39Б) показало, что [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-ABD-MMAF имел значимо ( $p < 0,05$ ) более низкое поглощение в печени через 4 часа и общее более низкое накопление в печени, чем другие конъюгаты. Поглощение в печени было вынесено на график как функция от времени, и рассчитана площадь под кривой (AUC). Значения AUC были схожи для конъюгатов [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-ABD-MMAE и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-ABD-DM1, в

то время как  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAF}}$  имел в 1,14 раза более низкое значение AUC, чем конъюгат, содержащий DM1.

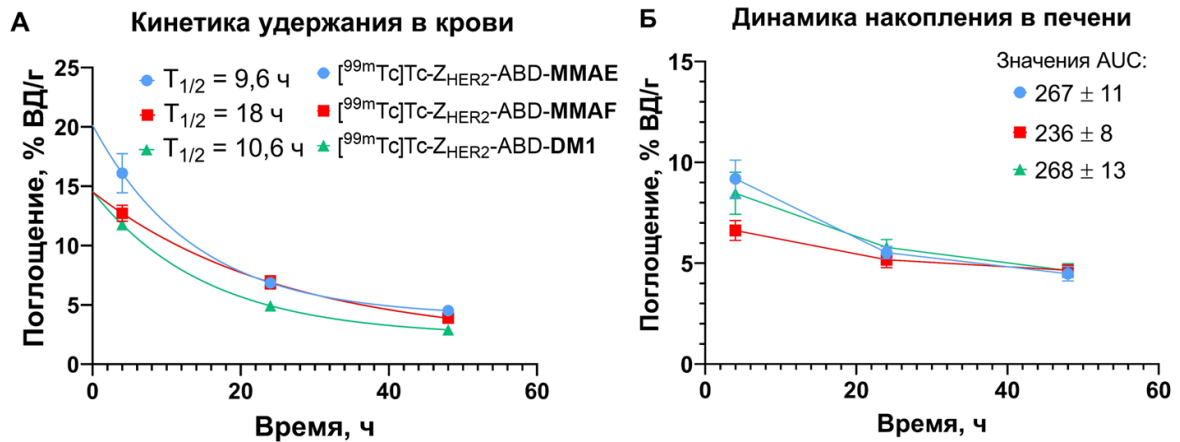


Рисунок 39 – Кинетика накопления активности в крови, представленная как функция от времени (А) и динамика поглощения активности в печени, представленная как площадь по кривой «поглощение-время» (AUC) (Б) для конъюгатов конъюгатов с разными цитотоксическими агентами в мышцах линии BALB/C nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3 (M ± SD)

Сравнение поглощения опухолью конъюгатов показало, что  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAF}}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-DM1}}$  имели схожее ( $p > 0,05$ ) поглощение опухолью во всех временных точках (рисунок 40). Накопление в опухоли увеличивалось с течением времени для всех конъюгатов, за исключением конъюгата с цитотоксическим агентом MMAE, имеющего тенденцию к снижению поглощения активности от 24 часов до 48 часов после инъекции. Через 4 часа после инъекции конъюгат с цитотоксином MMAE имел значимо более высокое ( $p < 0,05$ ) поглощение опухолью ( $6 \pm 1$  % ВД/г) по сравнению с конъюгатами с цитотоксинами MMAF ( $4 \pm 1$  % ВД/г) и DM1 ( $4 \pm 1$  % ВД/г). В последующие часовые точки значимых различий между накоплением в опухоли для конъюгатов не наблюдалось.

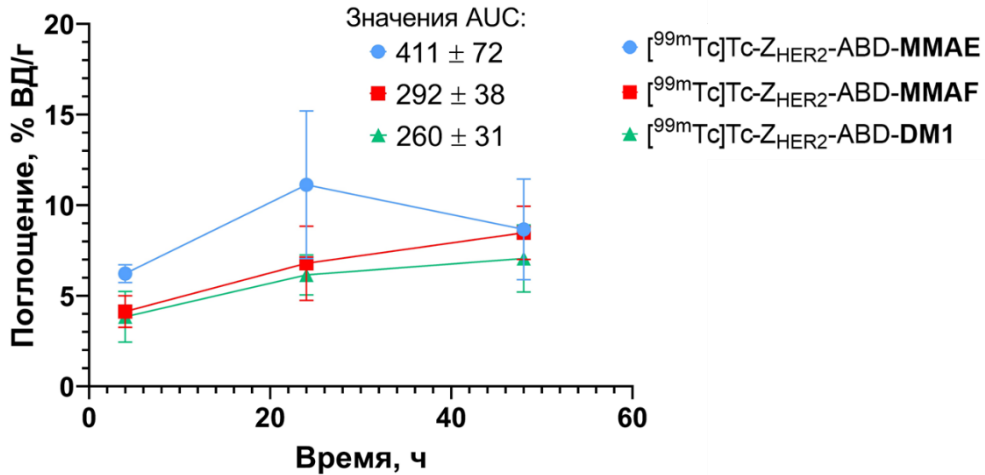
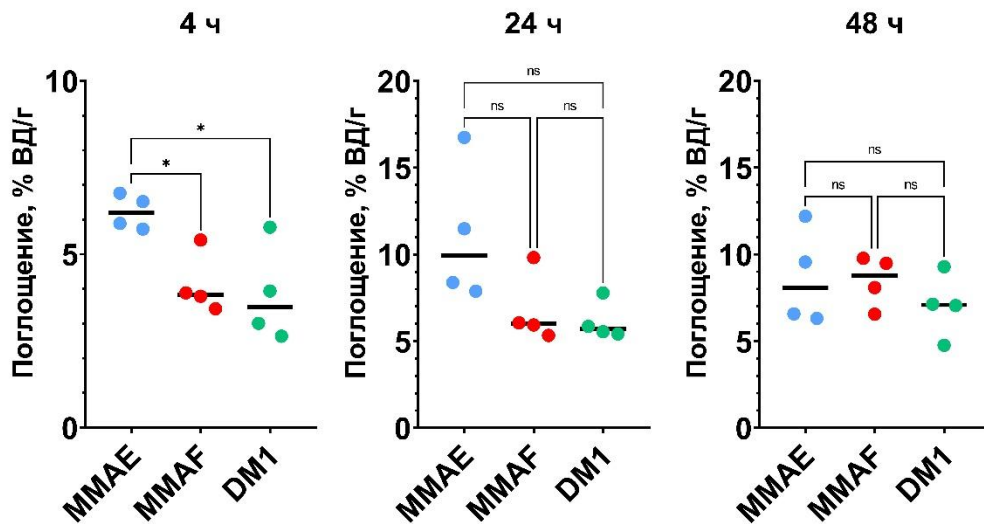


Рисунок 40 – Динамика накопления поглощения опухолью группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами в мышцах линии BALB/Vu/vu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3 ( $M \pm SD$ )

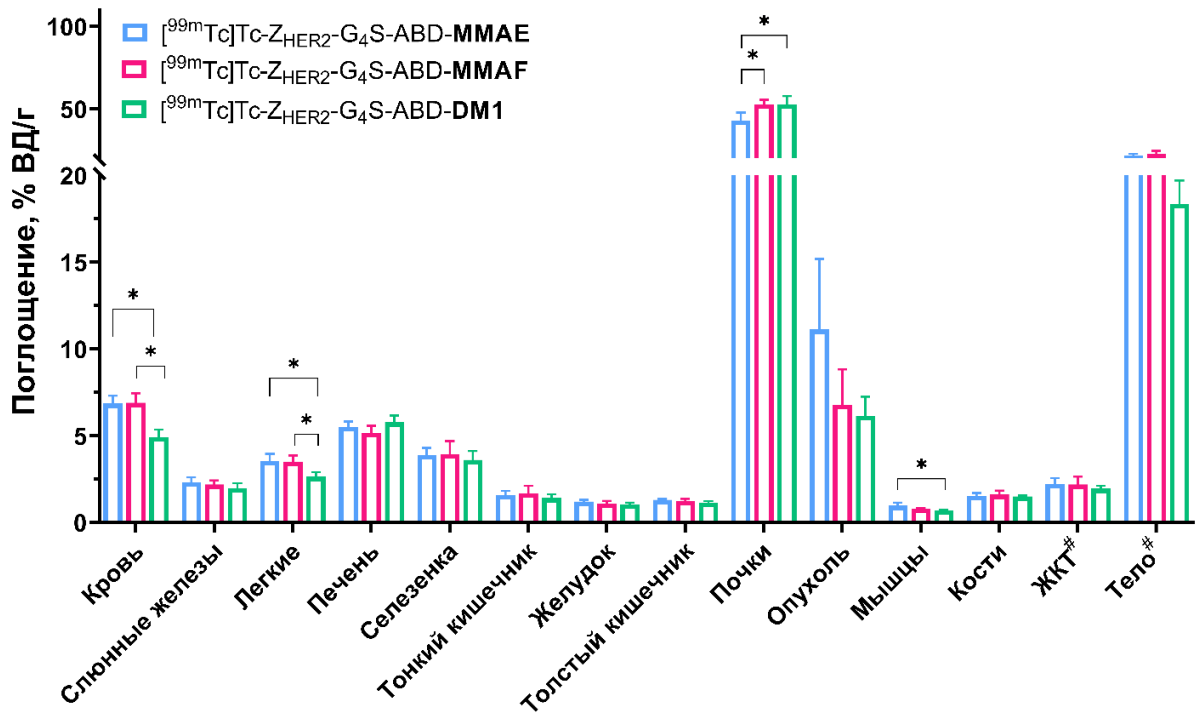


\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$   
 ns – статистически не значимые различия между группами при  $p > 0,05$   
 (one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

Рисунок 41 – Сравнение опухолевого поглощения в мышцах линии BALB/Vu/vu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3 для группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами через 4, 24 и 48 ч после инъекции

С течением времени накопление в большинстве здоровых органов снижалось для всех конъюгатов. Наиболее значимые различия в биораспределении среди группы наблюдались через 4 часа после инъекции, по

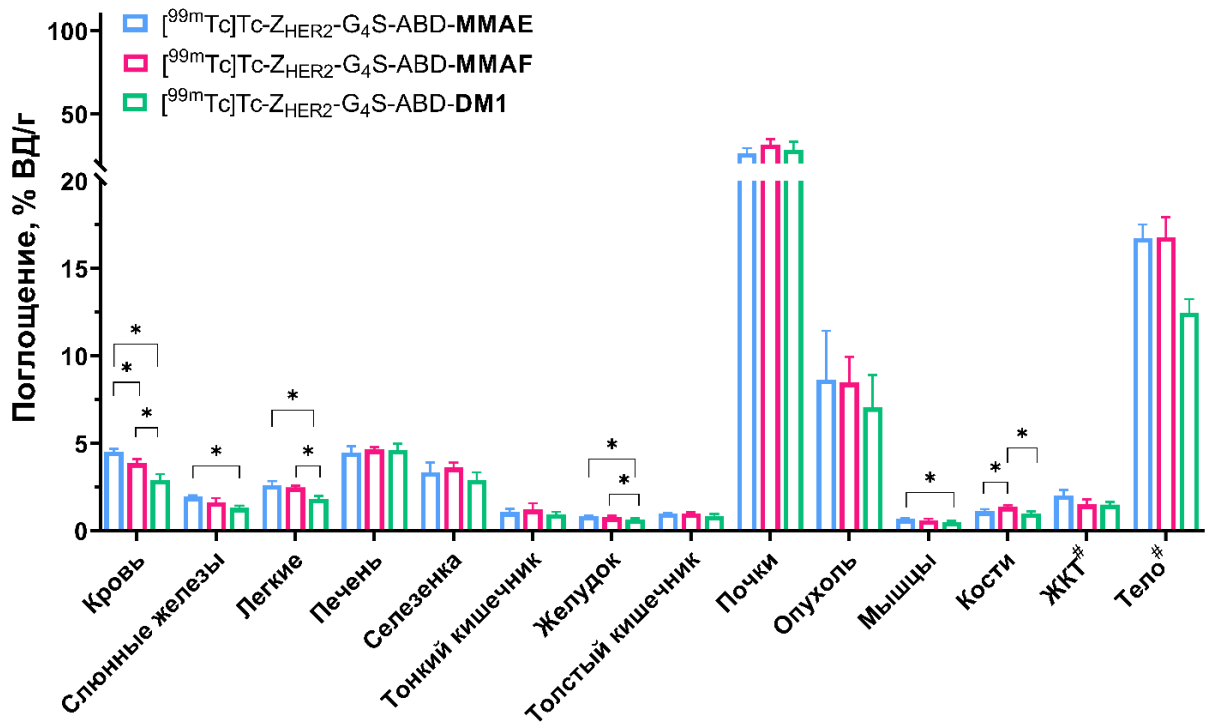
сравнению с более поздними временными точками. Через 4 часа после инъекции наблюдалось небольшое, но значимое ( $p < 0,05$ ) повышение поглощения активности в ряде здоровых органов (слюнных железах, легких, селезенке, желудке) для конъюгата с цитотоксином MMAE.



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$   
(one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 42 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами в мышах линии BALB/c nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3, через 24 ч после инъекции ( $M \pm SD$ )



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$   
(one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

# – данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 43 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами в мышах линии BALB/B nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3, через 48 ч ( $M \pm SD$ )

Сочетание низкого поглощения печенью и селезенкой вместе с высоким накоплением опухолью, а также высокой цитотоксичности в исследованиях *in vitro* сделало конъюгат [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-ABD-MMAF многообещающим кандидатом для оценки в экспериментальном терапевтическом исследовании в сравнении с изученным ранее [<sup>99m</sup>Tc]Tc-<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1.

### 3.5 Проведение экспериментальной терапии *in vivo* для оценки противоопухолевого эффекта группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами

Противоопухолевый эффект изучался на самках мышей BALB/c nu/nu на модели опухолевого роста на основе ксенографтов аденокарциномы

яичников SKOV3. Согласно результатам *in vitro* и *in vivo* оценки группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами, для терапевтического экспериментального исследования *in vivo* были выбраны конъюгаты  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$  (группа А) и  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$  (группа Б). В качестве контрольных веществ использовали конъюгат  $Z_{\text{Taq}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$  (группа В), содержащий не имеющую сродства к HER2 молекулу аффибоди  $Z_{\text{Taq}}$ , и PBS (группа Г). Как показано в исследовании Tianqi Xu с соавт. по изучению эскалации доз, введение  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -меченного конъюгата  $Z_{\text{HER2}:2891}\text{-ABD-E}_3\text{-mcDM1}$  в возрастающих дозах (от 2,4 до 30,3 мг/кг) самкам мышей линии BALB/c nu/nu с привитыми ксенотрансплантатами SKOV3, приводило к линейному увеличению абсолютного поглощения в опухоли с последующим насыщением после введенной дозы 15,1 мг/кг. Согласно терапевтическому исследованию *in vivo* Tianqi Xu с соавт., введение конъюгата в дозах 10,3 и 15,1 мг/кг обеспечивало эффективную регрессию опухолей с наблюдаемой тенденцией к потере массы тела животных при дозе 15,1 мг/кг [64]. На основании высокого цитотоксического эффекта  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$  в исследованиях *in vitro* для терапевтического экспериментального исследования *in vivo* с целью снижения потенциальной нецелевой токсичности конъюгата  $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$  для всех изучаемых конъюгатов была определена вводимая доза 2,9 мг/кг.

Динамика изменения объема опухолей в ходе терапевтического исследования в виде средних значений объема опухоли для оцениваемых групп представлена на рисунке 44. В контрольных группах кривые характеризовались резким углом наклона, в то время как терапия конъюгатами приводила к уплощению кривых, что свидетельствует о замедлении развития опухолей. Высокая вариабельность кинетики роста новообразований в группах может быть следствием гетерогенности опухоли. Индивидуальные объемы опухолей представлены в таблице В1 (приложение В),

индивидуальные кривые роста опухолей представлены на рисунке В.1 (приложение В).

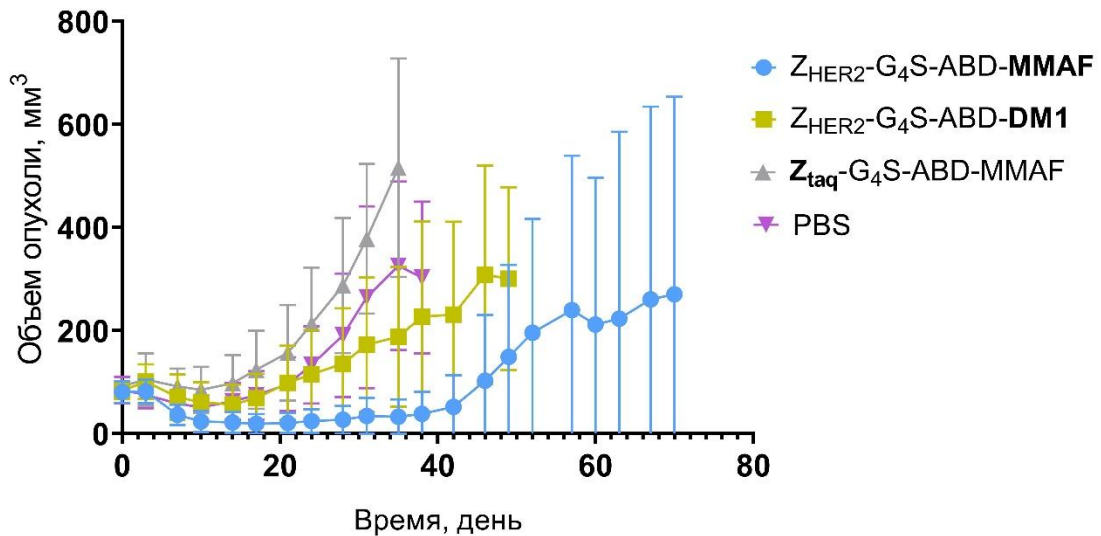
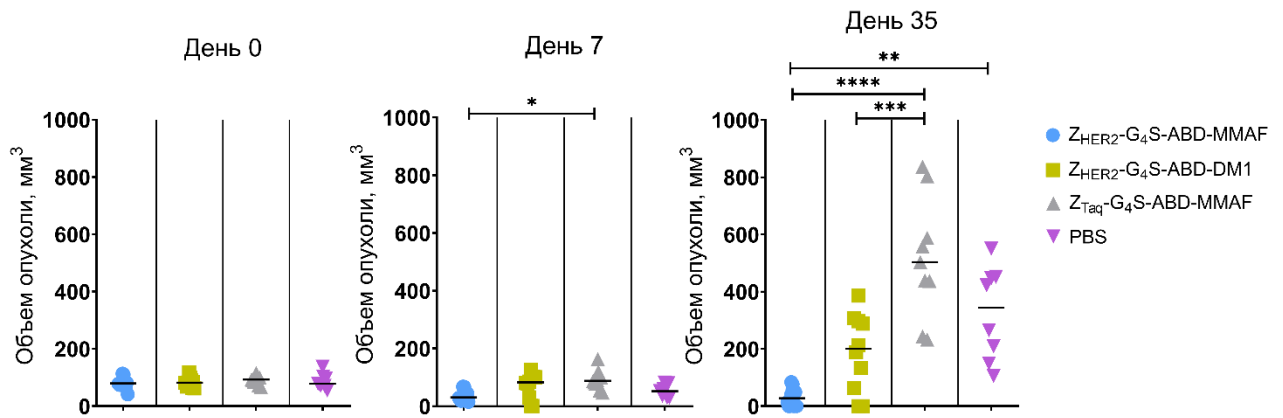


Рисунок 44 – Динамика изменения объема опухолей во время экспериментальной терапии ( $M \pm SD$ )

Результаты ANOVA теста изменения объема опухолей в ходе экспериментальной терапии представлены на рисунке 45. В начале исследования (день 0) не наблюдалось значимой разницы ( $p > 0,05$ ) между объемами опухолей в разных группах. На 7 день у мышей, получавших Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF, опухоли были значимо ( $p < 0,05$ ) меньше по сравнению с размерами опухолей в контрольной группе Z<sub>Taq</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF. На 35 день исследования после четырех циклов терапии у мышей в группе Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF были определены значимо меньшие размеры опухолей по сравнению с контрольными группами Z<sub>Taq</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF ( $p < 0,0001$ ) и PBS ( $p < 0,01$ ), в группе Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1 наблюдались значимо ( $p < 0,001$ ) меньшие размеры опухолей по сравнению с контрольной группой Z<sub>Taq</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF.



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$ , \*\* – при  $p < 0,01$ ,  
 \*\*\* – при  $p < 0,001$ , \*\*\*\* – при  $p < 0,0001$  (one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

Рисунок 45 – ANOVA тест изменения объема опухолей в день 0, день 7 и день 35 экспериментальной терапии

Результаты оценки показателя торможения роста опухоли (ТРО), выраженные в процентах от среднего объёма опухолей контрольной группы PBS (принятой за 100 %), свидетельствуют о существенном антипролиферативном эффекте в ходе терапии исследуемыми конъюгатами (рисунок 46). На 35 день исследования индекс ТРО для конъюгата  $Z_{HER2}\text{-}G_4\text{S-ABD-MMAF}$  составил 90 %, однако для конъюгата  $Z_{HER2}\text{-}G_4\text{S-ABD-DM1}$  данный показатель определен значительно ниже и достиг 42 %. Полученные значения свидетельствуют о высоком и устойчивом торможении роста новообразований для конъюгата  $Z_{HER2}\text{-}G_4\text{S-ABD-MMAF}$  в сравнении с контрольными группами и терапией конъюгатом  $Z_{HER2}\text{-}G_4\text{S-ABD-DM1}$ .

Показатель «время удвоения опухоли» (ВУО) характеризует скорость роста новообразования и определяется как период, необходимый для удвоения его объема. Высокие значения ВУО обоснованы эффективным подавлением роста новообразований в ответ на терапию, тогда как низкие значения служат индикатором агрессивной прогрессии. По результатам эксперимента были определены показатели ВУО для всех исследуемых групп (таблица 12). В контрольных группах наблюдался интенсивный рост опухолей, что

согласуется с естественным течением процесса неоплазии. Рост опухолей в группе  $Z_{HER2-G_4S-ABD-MMAF}$  и группе  $Z_{HER2-G_4S-ABD-DM1}$  был подавлен по сравнению с ростом опухолей в контрольных группах  $Z_{Taq-G_4S-ABD-MMAF}$  и PBS.

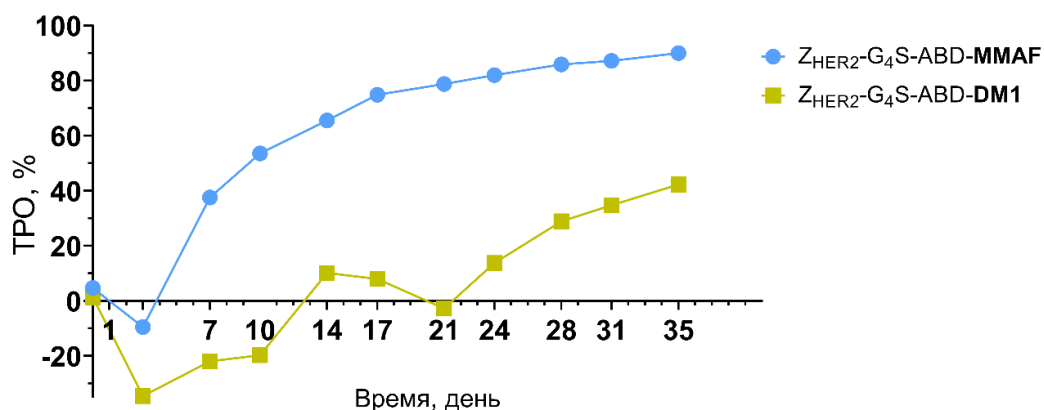


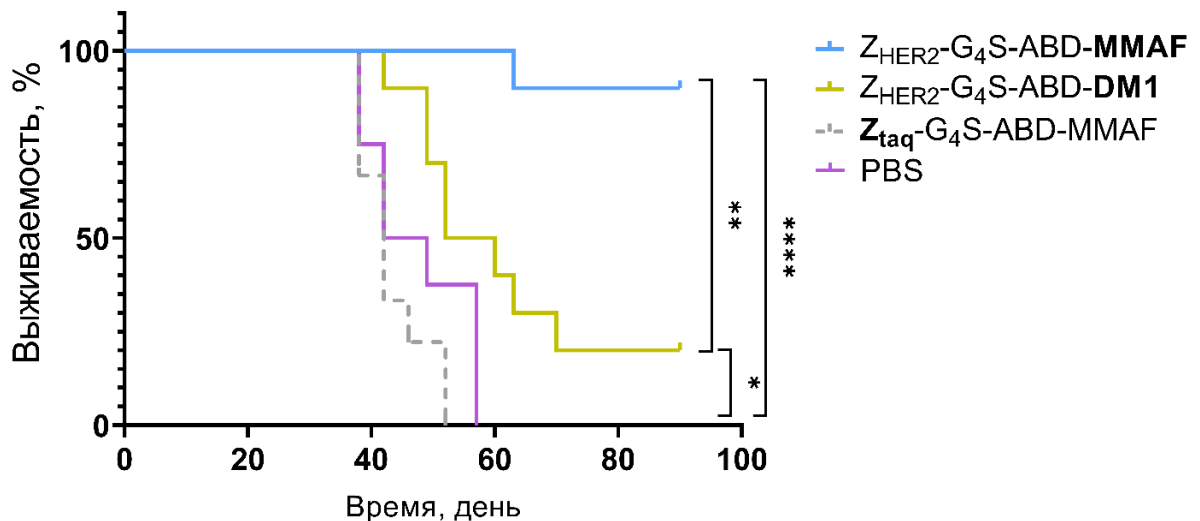
Рисунок 46 – Динамика индекса торможения роста опухоли (ТРО) во время экспериментальной терапии. Результаты представлены в виде процентов от среднего объема опухолей контрольной группы (PBS), принятого за 100 %

Таблица 12 – Время удвоения опухоли во время экспериментальной терапии

Исследуемая группа	Время удвоения опухоли, дни
$Z_{HER2-G_4S-ABD-MMAF}$	31 (95 % ДИ 21–49)
$Z_{HER2-G_4S-ABD-DM1}$	19 (95 % ДИ 14–25)
$Z_{Taq-G_4S-ABD-MMAF}$	10 (95 % ДИ 8–12)
PBS	12 (95 % ДИ 9–16)

Анализ и построение кривых выживаемости в эксперименте проводились по методу оценки Каплана–Майера с использованием логрангового критерия Мантеля–Кокса, результаты представлены на рисунке 47. Медиана выживаемости и УПЖ мышей линии Nu/J во время экспериментальной терапии представлены в таблице 13. В контрольных группах все мыши характеризовались экспоненциальным ростом опухоли и были подвергнуты эвтаназии в периоде между 35 и 57 днями исследования.

Для группы  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$  медиана выживаемости на конец исследования не была достигнута, для группы  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-DM1}}$  составила 56 дней, для контрольной группы  $Z_{\text{Taq-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$  — 42 дня, для контрольной группы PBS — 46 дней. Анализ показал значимое ( $p < 0,0001$ ) увеличение медианы выживаемости для группы конъюгата, содержащего цитотоксический агент монометилауристин F,  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$ , по сравнению с контрольными группами, а также по сравнению с группой конъюгата, содержащего эмтанзин,  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-DM1}}$  ( $p < 0,01$ ). Медиана выживаемости для группы  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-DM1}}$  достоверно ( $p < 0,05$ ) выше по сравнению с контрольными группами. Показатель УПЖ для группы  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-DM1}}$  составил 28%, для группы  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$  не был определен ввиду недостигнутой медианы выживаемости. Полученные данные демонстрируют наиболее высокую терапевтическую эффективность  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-MMAF}}$  в сравнении с  $Z_{\text{HER2-G}_4\text{S-ABD-DM1}}$  и контрольными группами.



\* – статистически значимые различия между группами при  $p < 0,05$ , \*\* – при  $p < 0,01$ ,  
 \*\*\*\* – при  $p < 0,0001$

Рисунок 47 – Кривые выживаемости мышей по методу Каплана–Майера с использованием логрангового критерия Мантеля–Кокса

Таблица 13 – Медиана выживаемости и увеличение медианной продолжительности жизни мышей линии Nu/J во время экспериментальной терапии (за 100 % принят показатель контрольной группы PBS)

Исследуемая группа	Медиана выживаемости, дни	Увеличение медианной продолжительности жизни, УПЖ, %
$Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}MMAF$	Не достигнута	Не определено
$Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}DM1$	56	28
$Z_{Taq}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}MMAF$	42	- 0,08
PBS	46	0

На момент окончания исследования (90 дней) в группе  $Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}MMAF$  у пяти из десяти (50 %) мышей наблюдалась полная ремиссия без видимых опухолей, у двух (20 %) мышей наблюдалась устойчивая ремиссия с макроскопическими опухолями, у трех (30 %) мышей наблюдался частичный ответ с задержкой роста опухоли (10 %) или изъязвлением опухоли без роста опухоли (20 %). В группе  $Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}DM1$  у двух из десяти (20 %) мышей наблюдалась полная ремиссия, у трех (30 %) мышей наблюдался частичный ответ, пять (50 %) мышей не отреагировали на лечение.

В течение всего исследования не было выявлено существенной ( $p > 0,05$ ) разницы в массе тела животных между группами (рисунок 48), что указывает на хорошую переносимость терапии. Патологическое исследование не обнаружило макроскопических поражений в печени или почках. Гистологическое исследование печени и почек мышей представлено на рисунках В3 и В4 (приложение В), соответственно. Наблюдалось легкое увеличение микровезикулярных жировых изменений у мыши А8, небольшая карицитомегалия у мышей А8 и Б5 и гепатоцеллюлярные митотические фигуры у мыши Г6, изменения находились в пределах нормы для групп животных. Мыши А10, Б7, Г9 и Д8 имели минимальный балл гломерулопатии и считались фоновыми поражениями.

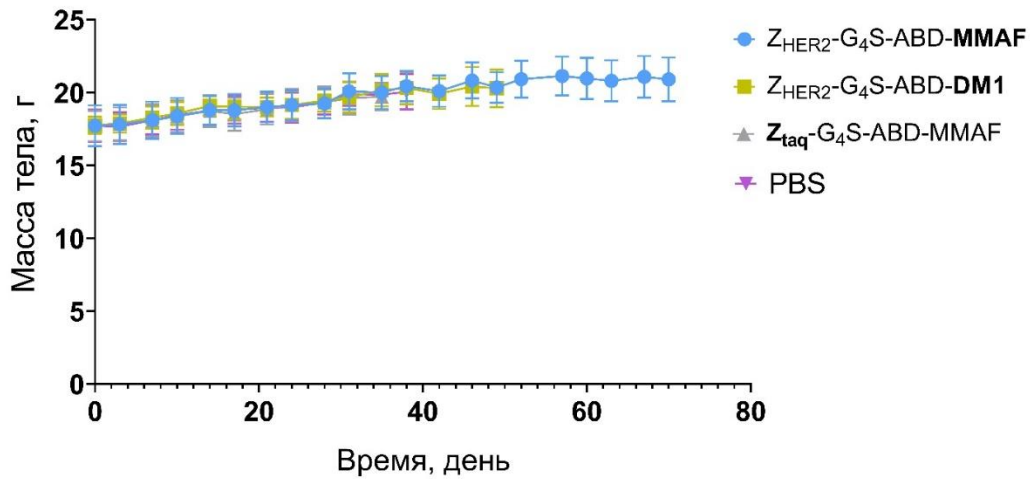


Рисунок 48 – Изменение массы тела мышей BALB/c nu/nu с ксенотрансплантатами SKOV3 во время экспериментальной терапии

В текущем исследовании Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF продемонстрировал наиболее сильный противоопухолевый эффект с эффективным ингибированием роста опухоли и значительным продлением выживаемости с полной ремиссией для 50 % мышей в группе. Противоопухолевый эффект обусловлен целевой доставкой цитотоксина MMAF, поскольку у мышей, получавших нецелевое контрольное соединение Z<sub>Taq</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF наблюдался экспоненциальный рост опухолей без видимого противоопухолевого эффекта. В группе Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1 также было выявлено значимое продление выживаемости по сравнению с мышами в контрольных группах с полной ремиссией опухоли для 20 % мышей, однако половина мышей не отреагировала на лечение в дозе, использованной в текущем исследовании.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкая распространенность HER2-позитивных опухолей, агрессивность их клинического развития и ограничения существующей HER2-направленной терапии обуславливают высокую потребность в разработке новых таргетных терапевтических агентов. Высокоаффинные каркасные белки аффибоди в составе терапевтического конъюгата представляют собой перспективную платформу для доставки цитотоксических агентов, выступая эффективной альтернативой моноклональным антителам. Гибкость молекулярного дизайна аффибоди позволяет регулировать фармакокинетические характеристики, сохраняя высокую аффинность таргетной молекулы и цитотоксичность доставляемого химиотерапевтического агента.

Наработана линейка терапевтических HER2-направленных конъюгатов на основе высокоаффинного каркасного белка аффибоди, содержащего междоменные глицин-сериновые линкеры  $G_4S$ ,  $(G_3S)_3$ ,  $(S_3G)_3$ , слитого с полипептидными фрагментами ABD, PAS или XTEN и конъюгированного с цитотоксическими агентами DM1, MMAE или MMAF и произведена идентификация и оценка их качества.

В исследованиях *in vitro* наиболее высокоактивные цитотоксические свойства проявил цитотоксический агент MMAF в составе конъюгата  $Z_{HER2}-G_4S-ABD-MMAF$ . Все исследуемые HER2-направленные конъюгаты характеризуются HER2-опосредованным специфичным связыванием. Все исследуемые HER2-направленные конъюгаты характеризуются высокой аффинностью к HER2-рецептору с двумя значениями констант равновесной диссоциации ( $K_d$ ) и двумя сайтами связывания, соответственно, –  $K_{d1}$  с высоким сродством к HER2 в низком наномолярном диапазоне и  $K_{d2}$  со сродством в субнаномолярном диапазоне.

Для всех исследуемых конъюгатов характерен почечный клиренс. Конъюгаты, содержащие линкеры с повторами серина, значительно снижали поглощение в печени по сравнению с конъюгатом с линкером G<sub>4</sub>S. Полипептиды с большей длиной аминокислотной цепи и, соответственно, с большей молекулярной массой, XTEN576, PAS600 и ABD, образующий комплекс с альбумином, наиболее эффективно увеличивали период полувыведения конъюгатов.

При сравнении конъюгатов с различными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения, [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-ABD-DM1 показал наилучшие соотношения активности опухоль-орган. Среди конъюгатов с разными цитотоксическими агентами накопление в опухоли значительно выше для [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-ABD-MMAF, по сравнению с [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-ABD-MMAE и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-ABD-DM1, также, как и накопление активности в нецелевых органах.

Экспериментальная терапия на BALB/c nu/nu мышях, несущих ксенографты аденокарциномы яичников SKOV3, показала, что рост опухоли в группе Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF и группе Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1 значительно ингибируется по сравнению с ростом опухоли в контрольных группах, но эффективнее в группе Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF. Медиана общей выживаемости значительно выше для группы Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF, чем для остальных трех сравниваемых групп, а также выше для Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1 по сравнению с двумя контрольными группами.

Конъюгаты Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-MMAF и Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1 рекомендуются как наиболее перспективные терапевтические агенты в проведенном исследовании. Полученные данные указывают на целесообразность проведения дальнейших доклинических и клинических исследований и обосновывают эффективность и перспективность применения таргетных конъюгатов на основе аффибоди для терапии HER2-экспрессирующих видов рака.

## ВЫВОДЫ

1. Нарботана линейка терапевтических HER2-направленных конъюгатов на основе каркасного белка аффибоди, содержащего междоменные глицин-сериновые линкеры  $G_4S$ ,  $(G_3S)_3$ ,  $(S_3G)_3$ , слитого с полипептидными фрагментами ABD, PAS или XTEN и конъюгированного с цитотоксическими агентами DM1, MMAE или MMAF, с чистотой свыше 95 %.

2. Определены цитотоксические свойства *in vitro* всех конъюгатов на HER2-позитивных клеточных линиях SKOV3, SKBR3 и AU565 со значениями  $IC_{50}$  в наномолярном диапазоне и наибольшим цитотоксическим действием конъюгата  $Z_{HER2}-G_4S-ABD-MMAF$ . Установлены HER2-опосредованное специфичное связывание всех конъюгатов и высокая аффинность связывания с HER2 всех конъюгатов с двумя значениями констант равновесной диссоциации ( $K_d$ ) и двумя сайтами связывания, соответственно, –  $K_{d1}$  с высоким сродством к HER2 в низком наномолярном диапазоне и  $K_{d2}$  со сродством в субнаномолярном диапазоне. Установлена медленная скорость интернализации (до 42% интернализованной активности через 24 ч инкубации) для всех конъюгатов без значимого влияния состава междоменного линкера, полипептидных фрагментов, увеличивающих период полувыведения, и цитотоксических агентов на уровень и скорость интернализации конъюгатов.

3. Установлено длительное удержание в крови и преобладающий почечный клиренс всех конъюгатов, значимое снижение поглощения активности в печени для конъюгатов, содержащих линкеры с повторами серина  $(G_3S)_3$  и  $(S_3G)_3$ , значимое увеличение периода полувыведения конъюгатов, содержащих полипептидные фрагменты с XTEN576, PAS600 и ABD<sub>035</sub>.

4. Установлено HER2-опосредованное специфичное опухолевое поглощение *in vivo* в ксенографтах аденокарциномы яичников SKOV3 для всех конъюгатов с наиболее высокими соотношениями «опухоль-орган» для [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD-DM1** в группе конъюгатов с различными полипептидами, увеличивающими период полувыведения, и конъюгата [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD-MMAE** в группе конъюгатов с разными цитотоксическими агентами.

5. Установлено, что Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD-MMAF** значительно ингибирует рост опухоли у мышей с HER2-позитивными ксенографтами аденокарциномы рака яичников SKOV3 с недостигнутой медианой выживаемости в течение 90 дней исследования и полной ремиссией без видимых опухолей у 50 % мышей в дозе 2,9 мг/кг. В исследуемой дозе Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD-MMAF** имеет большую эффективность, по сравнению с конъюгатом Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD-DM1**, медиана выживаемости которого составила 57 дней. Исследуемые конъюгаты в дозе 2,9 мг/кг не вызывают патологических изменений в почках, печени и потерю в массе тела у животных.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, ТЕРМИНОВ

% ВД/г – процент введенной дозы на грамм

ADC – Antibody-Drug Conjugates – конъюгаты антитело-лекарственное средство

ADCC – Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity – антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность

ADCP – Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis – антителозависимый клеточный фагоцитоз

CDC – Complement-Dependent Cytotoxicity – комплемент-зависимая цитотоксичность

DM1 – эмтанзин

DM4 – равтанзин

EGF – Epidermal Growth Factor – эпидермальный фактор роста

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor – рецептор эпидермального

Fab – Fragment antigen binding – участок связывания антигена

HER2 – Human Epidermal growth factor Receptor 2 – рецептор эпидермального фактора роста, тип 2

IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования

МАРК – Mitogen-Activated Protein Kinase – митогенактивируемая

МНС – Major Histocompatibility Complex – главный комплекс гистосовместимости

ММАЕ – монометилауристатин E

ММАF – монометилауристатин F

OD<sub>600</sub> – optical density, 600 nm – оптическая плотность образца, измеренная при длине волны 600 нм на 1 см пути света

PBS – Phosphate Buffered Saline – фосфатно-буферный раствор

PI3K – Phosphoinositide 3-kinase – фосфатидилинозитол-3-киназа

- scFv – single-chain variable Fragment – одноцепочечные переменные
- SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis - гель-электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
- TCEP – Tris-(2-CarboxyEthyl)Phosphine, Hydrochloride) – трис(2-карбоксиитил)фосфин гидрохлорид
- WST-8 – (2-(2-метокси-4-нитропентил)-3-(4-нитропентил)-5-(2,4-дисульфобензил)-2Н-тетразолиум)
- WSTs – Water-Soluble Tetrazolium salts – водорастворимые тетразолиевые соли
- а.о. – аминокислотные остатки
- АКБ – альтернативный каркасный белок
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ДИ – доверительный интервал
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- мкАТ – моноклональное антитело
- МТТ – 4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид
- НАДФ-Н – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
- ОВ – общая выживаемость
- ОФ-ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
- ПАБК – пара-аминобензойная кислота
- Радио-ТСХ – тонкослойная радиохроматография
- РМЖ – рак молочной железы
- РХВ – радиохимический выход
- РХЧ – радиохимическая чистота
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусной кислоты

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Альтернативные каркасные белки / Л. Е. Петровская, Л. Н. Шингарова, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников // Биоорганическая Химия. – 2011. – Т. 37, № 5. – С. 581-591.
2. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований / О. Д. Брагина, В. И. Чернов, Р. Зельчан [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 125-133.
3. Альтшулер Е. П. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности / Е. П. Альтшулер, Д. В. Серебряная, А. Г. Катруха // Успехи биологической химии. — 2010. — Т. 50. — С. 203–258.
4. Белки семейства p53 в ответе опухолевых клеток на ионизирующее излучение: развитие проблемы / О. А. Кучур, Д. О. Кузьмина, М. С. Духинова, А. А. Штиль // Acta Naturae. – 2021. – Т. 13. – Белки семейства p53 в ответе опухолевых клеток на ионизирующее излучение. – № 3. – С. 65-76.
5. Деев С. М. Новые подходы к диагностике и терапии социально значимых заболеваний / С. М. Деев, Е. Н. Лебеденко // Астраханский медицинский журнал. – 2015. – Т. 10. – № 3. – С. 82-91.
6. Клинические возможности диагностики HER2-позитивного рака молочной железы с применением альтернативных каркасных белков / О. Д. Брагина, В. И. Чернов, С. М. Деев, В. М. Толмачев // Бюллетень сибирской медицины. – 2022. – Т. 21, № 3. – С. 132-139.
7. Молекулярные мишени таргетной терапии злокачественных новообразований / В. В. Боденко, М. С. Ларькина, А.С. Прач [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2024. – Т. 23, № 2. – С. 101-113.
8. Стратегия разработки таргетных препаратов для терапии HER2-позитивного рака молочной железы / В. В. Боденко, М. С. Ларькина, М. С. Третьякова, М. В. Белоусов, В. И. Чернов // Сибирский онкологический журнал. – 2025. – Т. 24, № 3. – С. 135-148.

9. Эволюция анти-HER2 терапии при распространенном HER2+ раке молочной железы, или «почему трастузумаб до сих пор остается ключевым игроком?» / К. С. Гречухина, М. В. Сухова, Е. М. Коляго [и др.] // Современная онкология. – 2025. – Т. 27, № 1. – С. 18-24.

10. A case of sustained tumor regression with MP0274, a novel DARPIn therapeutic targeting Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 signaling, in Metastatic Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive breast cancer after prior trastuzumab and pertuzumab / S. Fischer, T. O. Götze, A. Omlin [et al.] // JCO Precision Oncology. – 2022. – Vol. 6. – P. e2200006.

11. A HER2-targeting antibody-drug conjugate, trastuzumab deruxtecan (DS-8201a), enhances antitumor immunity in a mouse model / T. N. Iwata, C. Ishii, S. Ishida [et al.] // Molecular Cancer Therapeutics. – 2018. – Vol. 17, № 7. – P. 1494-1503.

12. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor / E. Tzahar, H. Waterman, X. Chen [et al.] // Molecular and Cellular Biology. – 1996. – Vol. 16, № 10. – P. 5276-5287.

13. A long-acting human growth hormone with delayed clearance (VRS-317): results of a double-blind, placebo-controlled, single ascending dose study in growth hormone–deficient adults / K. C. J. Yuen, G. S. Conway, V. Popovic [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. – 2013. – Vol. 98, № 6. – P. 2595-2603.

14. A novel long-acting human growth hormone fusion protein (VRS-317): enhanced in vivo potency and half-life / J. L. Cleland, N. C. Geething, J. A. Moore [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2012. – Vol. 101. – A Novel Long-Acting Human Growth Hormone Fusion Protein (VRS-317). – № 8. – P. 2744-2754.

15. A phase 1b/2 study evaluating efficacy and safety of MP0250, a designed ankyrin repeat protein (DARPIn) simultaneously targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF), in combination with

bortezomib and dexamethasone, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma / S. Knop, M. Szarejko, N. Grząsko [et al.] // *EJHaem.* – 2024. – Vol. 5, № 5. – P. 940-950.

16. A randomized safety and efficacy study of somavaratan (VRS-317), a long-acting rhgh, in pediatric growth hormone deficiency / W. V. Moore, H. J. Nguyen, G. B. Kletter [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2016. – Vol. 101, № 3. – P. 1091-1097.

17. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner / V. Schellenberger, C. Wang, N. C. Geething [et al.] // *Nature Biotechnology.* – 2009. – Vol. 27, № 12. – P. 1186-1190.

18. Abdelgawad H. A. H. Nothing short of a revolution: Novel extended half-life factor VIII replacement products and non-replacement agents reshape the treatment landscape in hemophilia A / H. A. H. Abdelgawad, R. Foster, M. Otto // *Blood Reviews.* – 2024. – Vol. 64. – P. 101164.

19. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer / R. Bose, S. M. Kavuri, A. C. Searleman [et al.] // *Cancer discovery.* – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. 224-237.

20. Advances in HER2-targeted therapies: from monoclonal antibodies to dual inhibitors developments in cancer treatment / M. Bhagyalalitha, A. Handattu Shankaranarayana, S. Arun Kumar [et al.] // *Bioorganic Chemistry.* – 2024. – Vol. 151. — P. 107695.

21. Adverse events of trastuzumab emtansine (T-DM1) in the treatment of HER2-positive breast cancer patients / L. Kowalczyk, R. Bartsch, C. F. Singer, A. Farr // *Breast Care.* – 2017. – Vol. 12, № 6. – P. 401-408.

22. Affibody molecules in biotechnological and medical applications / S. Ståhl, T. Gräslund, A. Eriksson Karlström [et al.] // *Trends in Biotechnology.* – 2017. – Vol. 35, № 8. – P. 691-712.

23. Affibody molecules intended for receptor-mediated transcytosis via the transferrin receptor / L. C. Hjelm, H. Lindberg, S. Ståhl, J. Löfblom // *Pharmaceuticals*. – 2023. – Vol. 16, № 7. – P. 956.

24. Affibody PET imaging of HER2-expressing cancers as a key to guide HER2-targeted therapy / N. Eissler, R. Altena, A. Alhuseinalkhudhur [et al.] // *Biomedicines*. – 2024. – Vol. 12, № 5. – P. 1088.

25. Affibody-derived drug conjugates: potent cytotoxic molecules for treatment of HER2 over-expressing tumors / M. Altai, H. Liu, H. Ding [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2018. – Vol. 288. – P. 84-95.

26. Affibody-mediated PET imaging of HER3 expression in malignant tumours / M. Rosestedt, K. G. Andersson, B. Mitran [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 15226.

27. Affitoxin – a novel recombinant, HER2-Specific, anti-cancer agent for targeted therapy of HER2-positive tumors / R. Zielinski, I. Lyakhov, A. Jacobs [et al.] // *Journal of Immunotherapy*. – 2009. – Vol. 32, № 8. – P. 817-825.

28. Ahuja S. Understanding the spectrum of HER2 status in breast cancer: from HER2-positive to ultra-low HER2 / S. Ahuja, A. A. Khan, S. Zaheer // *Pathology - Research and Practice*. – 2024. – Vol. 262. – P. 155550.

29. Albinterferon alpha-2b: a genetic fusion protein for the treatment of chronic hepatitis C / G. M. Subramanian, M. Fiscella, A. Lamousé-Smith [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2007. – Vol. 25, № 12. – P. 1411-1419.

30. Albugranin, a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) genetically fused to recombinant human albumin induces prolonged myelopoietic effects in mice and monkeys / W. Halpern, T. A. Riccobene, H. Agostini [et al.] // *Pharmaceutical Research*. – 2002. – Vol. 19, № 11. – P. 1720-1729.

31. Albumin Binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins / M. S. Dennis, M. Zhang, Y. G. Meng [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277, № 38. – P. 35035-35043.

32. Amani N. ADCs, as novel revolutionary weapons for providing a step forward in targeted therapy of malignancies / N. Amani, F. A. Dorkoosh, H. Mobedi // *Current Drug Delivery*. – 2020. – Vol. 17, № 1. – P. 23-51.

33. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents / R. P. Garay, R. El-Gewely, J. K. Armstrong [et al.] // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2012. – Vol. 9, № 11. – P. 1319-1323.

34. Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen / Y. V. Kovtun, C. A. Audette, Y. Ye [et al.] // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, № 6. – P. 3214-3221.

35. Antibody-drug conjugates for cancer therapy: chemistry to clinical implications / N. Dan, S. Setua, V. K. Kashyap [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2018. – Vol. 11, № 2. – P. 32.

36. Antibody-drug conjugates: functional principles and applications in oncology and beyond / C. Theocharopoulos, P.-P. Lialios, M. Samarkos [et al.] // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9, № 10. – P. 1111.

37. Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing / H. K. Erickson, P. U. Park, W. C. Widdison [et al.] // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, № 8. – P. 4426-4433.

38. Anti-serum albumin domain antibodies for extending the half-lives of short lived drugs / L. J. Holt, A. Basran, K. Jones [et al.] // *Protein engineering, design & selection: PEDS*. – 2008. – Vol. 21, № 5. – P. 283-288.

39. Antitumor efficacy of a combination of CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), a CD22-targeted cytotoxic immunoconjugate of calicheamicin, and rituximab against non-Hodgkin's B-cell lymphoma / J. F. DiJoseph, M. M. Dougher, L. B. Kalyandrug [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12, № 1. – P. 242-249.

40. Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays / K. Chamchoy, D. Pakotiprapha, P. Pumirat [et al.] // *BMC Biochemistry*. – 2019. – Vol. 20. – P. 4.

41. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia / P. F. Bross, J. Beitz, G. Chen [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2001. – Vol. 7, № 6. – P. 1490-1496.

42. Ashman N. Non-internalising antibody–drug conjugates / N. Ashman, J. D. Bargh, D. R. Spring // *Chemical Society Reviews*. – 2022. – Vol. 51, № 22. – P. 9182-9202.

43. Association of HER-2 overexpression with prognosis in nonsmall cell lung carcinoma: a metaanalysis / H. Nakamura, N. Kawasaki, M. Taguchi, K. Kabasawa // *Cancer*. – 2005. – Vol. 103, № 9. – P. 1865-1873.

44. Barok M. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance / M. Barok, H. Joensuu, J. Isola // *Breast cancer research: BCR*. – 2014. – Vol. 16. – Trastuzumab emtansine. – № 2. – P. 209.

45. Binder U. PASylated thymosin  $\alpha 1$ : a long-acting immunostimulatory peptide for applications in oncology and virology / U. Binder, A. Skerra // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 22, № 1. – P. 124.

46. Binder U. Strategies for extending the half-life of biotherapeutics: successes and complications / U. Binder, A. Skerra // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2025. – Vol. 25, № 1. – P. 93-118.

47. Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain / K. Nord, E. Gunneriusson, J. Ringdahl [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 1997. – Vol. 15, № 8. – P. 772-777.

48. Biodistribution and radiation dosimetry of the anti-HER2 affibody molecule  $^{68}\text{Ga}$ -ABY-025 in breast cancer patients / M. Sandström, K. Lindskog, I. Velikyan [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. – 2016. – Vol. 57, № 6. – P. 867-871.

49. Biodistribution of a bispecific single-chain diabody and its half-life extended derivatives / R. Stork, E. Campigna, B. Robert [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284, № 38. – P. 25612-25619.

50. Björke H. Measuring the affinity of a radioligand with its receptor using a rotating cell dish with in situ reference area / H. Björke, K. Andersson // *Applied Radiation and Isotopes*. – 2006. – Vol. 64, № 1. – P. 32-37.

51. Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity / G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, L. Padilla [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2002. – Vol. 13, № 4. – P. 855-869.

52. Chari R. V. J. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs / R. V. J. Chari // *Accounts of Chemical Research*. – 2008. – Vol. 41, № 1. – P. 98-107.

53. Cheng X. A Comprehensive review of HER2 in cancer biology and therapeutics / X. Cheng // *Genes*. – 2024. – Vol. 15, № 7. – P. 903.

54. Chuang V. T. G. Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin / V. T. G. Chuang, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri // *Pharmaceutical Research*. – 2002. – Vol. 19, № 5. – P. 569-577.

55. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) shows less effect on multidrug resistant cells: analyses in cell lines and cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia and lymphoma / A. Takeshita, K. Shinjo, N. Yamakage [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2009. – Vol. 146, № 1. – P. 34-43.

56. Comparative evaluation of affibody- and antibody fragments-based CAIX imaging probes in mice bearing renal cell carcinoma xenografts / J. Garousi, F. J. Huizing, A. Vorobyeva [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 14907.

57. Co-occurring gain-of-function mutations in HER2 and HER3 modulate HER2/HER3 activation, oncogenesis, and HER2 inhibitor sensitivity / A. B. Hanker, B. P. Brown, J. Meiler [et al.] // *Cancer Cell*. – 2021. – Vol. 39, № 8. – P. 1099-1114.e8.

58. De P. Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance? / P. De, M. Hasmann, B. Leyland-Jones // *Cancer Treatment Reviews*. – 2013. – Vol. 39, № 8. – P. 925-934.

59. Design of an optimized scaffold for affibody molecules / J. Feldwisch, V. Tolmachev, C. Lendel [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 398, № 2. – P. 232-247.

60. Development and evaluation of  $\beta$ -galactosidase-sensitive antibody-drug conjugates / S. Kolodych, C. Michel, S. Delacroix [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 142. – P. 376-382.

61. Development and properties of beta-glucuronide linkers for monoclonal antibody-drug conjugates / S. C. Jeffrey, J. B. Andreyka, S. X. Bernhardt [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2006. – Vol. 17, № 3. – P. 831-840.

62. Development of a clonal and high-yield mammalian cell line for the manufacturing of a hyperactive human dnase i with extended plasma half-life using PASylation® technology / S. M. Stamm, R. Wagner, D. A. Lang [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 16, № 7. – P. 967.

63. Doxorubicin immunoconjugates containing bivalent, lysosomally-cleavable dipeptide linkages / G. M. Dubowchik, S. Radia, H. Mastalerz [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2002. – Vol. 12, № 11. – P. 1529-1532.

64. Drug conjugates based on a monovalent affibody targeting vector can efficiently eradicate HER2 positive human tumors in an experimental mouse model / T. Xu, H. Ding, A. Vorobyeva [et al.] // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. 85.

65. Dyson H. J. Intrinsically unstructured proteins and their functions / H. J. Dyson, P. E. Wright // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2005. – Vol. 6, № 3. – P. 197-208.

66. Efanesoctocog alfa: the renaissance of Factor VIII replacement therapy / Y. Dargaud, A. Leuci, A. R. Ruiz, S. Lacroix-Desmazes // *Haematologica*. – 2024. – Vol. 109, № 8. – P. 2436-2444.

67. Effect of inter-domain linker composition on biodistribution of ABD-fused affibody-drug conjugates targeting HER2 / T. Xu, J. Zhang, M. Oroujeni [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, № 3. – P. 522.

68. Effective rational humanization of a PASylated anti-galectin-3 Fab for the sensitive PET imaging of thyroid cancer in vivo / E. Peplau, F. De Rose, A. Eichinger [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 7358.

69. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size / C. Zahnd, M. Kawe, M. T. Stumpp [et al.] // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70, № 4. – P. 1595-1605.

70. Engineering of a femtomolar affinity binding protein to human serum albumin / A. Jonsson, J. Dogan, N. Herne [et al.] // *Protein engineering, design & selection: PEDS*. – 2008. – Vol. 21, № 8. – P. 515-527.

71. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity / S. O. Doronina, B. A. Mendelsohn, T. D. Bovee [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2006. – Vol. 17, № 1. – P. 114-124.

72. Enhanced in vivo efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis / D. Harari, N. Kuhn, R. Abramovich [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289, № 42. – P. 29014-29029.

73. Evaluation of a novel <sup>177</sup>Lu-labelled therapeutic affibody molecule with a deimmunized ABD domain and improved biodistribution profile / Y. Liu, M. Oroujeni, Y. Liao [et al.] // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. – 2024. – Vol. 51, № 13. – P. 4038-4048.

74. Evaluation of ABD-Linked RM26 conjugates for GRPR-targeted drug delivery / Á. Nagy, A. Abouzayed, P. Kanellopoulos [et al.] // *ACS omega*. – 2024. – Vol. 9, № 34. – P. 36122-36133.

75. Evaluation of maleimide derivative of DOTA for site-specific labeling of recombinant affibody molecules / S. Ahlgren, A. Orlova, D. Rosik [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2008. – Vol. 19, № 1. – P. 235-243.

76. Experimental HER2-targeted therapy using ADAPT6-ABD-mcDM1 in mice bearing SKOV3 ovarian cancer xenografts: efficacy and selection of companion imaging counterpart / J. Garousi, T. Xu, Y. Liu [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – Experimental HER2-Targeted Therapy Using ADAPT6-ABD-mcDM1 in Mice Bearing SKOV3 Ovarian Cancer Xenografts. – № 8. – P. 1612.

77. Experimental therapy of HER2-expressing xenografts using the second-generation HER2-targeting affibody molecule  $^{188}\text{Re}$ -ZHER2:41071 / Y. Liu, A. Vorobyeva, A. Orlova [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – Experimental Therapy of HER2-Expressing Xenografts Using the Second-Generation HER2-Targeting Affibody Molecule  $^{188}\text{Re}$ -ZHER2. – № 5. – P. 1092.

78. Expression, purification, and biological evaluation of XTEN-GCSF in a neutropenic rat model / F. Y. Nikraves, P. Gholami, E. Bayat [et al.] // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2024. – Vol. 196, № 2. – P. 804-820.

79. Extended in vivo half-life of human soluble complement receptor type 1 fused to a serum albumin-binding receptor / S. C. Makrides, P. A. Nygren, B. Andrews [et al.] // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1996. – Vol. 277, № 1. – P. 534-542.

80. Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain / J. T. Andersen, R. Pehrson, V. Tolmachev [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, № 7. – P. 5234-5241.

81. Extension of in vivo half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers / V. N. Podust, S. Balan, B.-C. Sim [et al.] // *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. – 2016. – Vol. 240. – P. 52-66.

82. Feldwisch J. Engineering of affibody molecules for therapy and diagnostics / J. Feldwisch, V. Tolmachev // *Methods in Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 899. – P. 103-126.

83. First in-human medical imaging with a PASylated <sup>89</sup>Zr-Labeled anti-HER2 Fab-fragment in a patient with metastatic breast cancer / A. Richter, K. Knorr, M. Schlapschy [et al.] // *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. – 2020. – Vol. 54, № 2. – P. 114-119.

84. First-in-human phase I study of PRS-050 (Angiocal), an anticalin targeting and antagonizing VEGF-A, in patients with advanced solid tumors / K. Mross, H. Richly, R. Fischer [et al.] // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. e83232.

85. Freeman M. R. HER2/HER3 heterodimers in prostate cancer: Whither HER1/EGFR? / M. R. Freeman // *Cancer Cell*. – 2004. – Vol. 6, № 5. – P. 427-428.

86. Fusion of an albumin-binding domain extends the half-life of immunotoxins / R. Guo, W. Guo, L. Cao [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 511, № 1. – P. 538-549.

87. Fusion to an albumin-binding domain with a high affinity for albumin extends the circulatory half-life and enhances the in vivo antitumor effects of human TRAIL / R. Li, H. Yang, D. Jia [et al.] // *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. – 2016. – Vol. 228. – P. 96-106.

88. Gcg-XTEN: an improved glucagon capable of preventing hypoglycemia without increasing baseline blood glucose / N. C. Geething, W. To, B. J. Spink [et al.] // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5, № 4. – P. e10175.

89. Gebauer M. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics: Next Generation Therapeutics / M. Gebauer, A. Skerra // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2009. – Vol. 13, № 3. – P. 245-255.

90. Gemtuzumab ozogamicin: time to resurrect? / F. Ravandi, E. H. Estey, F. R. Appelbaum [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30, № 32. – P. 3921-3923.

91. Generation and characterization of a novel small biologic alternative to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) antibodies, DS-9001a, albumin binding domain-fused anticalin protein / Y. Masuda, S. Yamaguchi, C. Suzuki [et al.] // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2018. – Vol. 365, № 2. – P. 368-378.

92. GLP2-2G-XTEN: a pharmaceutical protein with improved serum half-life and efficacy in a rat Crohn's disease model / S. E. Alters, B. McLaughlin, B. Spink [et al.] // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7, № 11. – P. e50630.

93. Gondi C. S. Cathepsin B as a cancer target / C. S. Gondi, J. S. Rao // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2013. – Vol. 17, № 3. – P. 281-291.

94. Goulet D. R. Considerations for the design of antibody-based therapeutics / D. R. Goulet, W. M. Atkins // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2020. – Vol. 109, № 1. – P. 74-103.

95. HEHEHE-tagged affibody molecule may be purified by IMAC, is conveniently labeled with  $[^{99(m)}\text{Tc}(\text{CO})_3]^{(+)}$ , and shows improved biodistribution with reduced hepatic radioactivity accumulation / V. Tolmachev, C. Hofström, J. Malmberg [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2010. – Vol. 21, № 11. – P. 2013-2022.

96. HER2/ ERBB2 immunohistochemical expression and copy number status in ovarian mucinous tumors / M. C. Smithgall, A. Yemelyanova, S. Mathew [et al.] // *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. – 2024. – Vol. 43, № 2. – P. 134-139.

97. HER2 expression in an endometrial cancer cohort / K. E. Hacker, K. A. Fleming, M. Gupta, B. Pothuri // *Gynecologic Oncology*. – 2025. – Vol. 201. – P. 1-6.

98. HER2 expression, test deviations, and their impact on survival in metastatic gastric cancer: results from the prospective multicenter VARIANZ study / I. Haffner, K. Schierle, E. Raimúndez [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. –

2021. – Vol. 39. – HER2 Expression, Test Deviations, and Their Impact on Survival in Metastatic Gastric Cancer. – № 13. – P. 1468-1478.

99. HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients / M. Tuefferd, J. Couturier, F. Penault-Llorca [et al.] // PLoS ONE. – 2007. – Vol. 2. – HER2 Status in Ovarian Carcinomas. – № 11. – P. e1138.

100. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach / J. Rüschoff, W. Hanna, M. Bilous [et al.] // Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. – 2012. – Vol. 25, № 5. – P. 637-650.

101. HER2 testing in gastric cancer diagnosis: insights on variables influencing HER2-positivity from a large, multicenter, observational study in Germany / G. Baretton, H. H. Kreipe, P. Schirmacher [et al.] // Virchows Archiv. – 2019. – Vol. 474, № 5. – P. 551-560.

102. HER2-affitoxin: a potent therapeutic agent for the treatment of HER2-overexpressing tumors / R. Zielinski, I. Lyakhov, M. Hassan [et al.] // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2011. – Vol. 17, № 15. – P. 5071-5081.

103. HER2/HER3 heterodimers and p21 expression are capable of predicting adjuvant trastuzumab response in HER2+ breast cancer / A. R. Green, F. F. T. Barros, T. M. A. Abdel-Fatah [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2014. – Vol. 145, № 1. – P. 33-44.

104. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer / S. Signoretti, R. Montironi, J. Manola [et al.] // Journal of the National Cancer Institute. – 2000. – Vol. 92, № 23. – P. 1918-1925.

105. HER2-specific pseudomonas exotoxin a PE25 based fusions: influence of targeting domain on target binding, toxicity, and in vivo biodistribution / H. Ding, M. Altai, W. Yin [et al.] // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12. – HER2-Specific Pseudomonas Exotoxin A PE25 Based Fusions. – № 4. – P. 391.

106. High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation / C. T. Mendler, L. Friedrich, I. Laitinen [et al.] // *mAbs*. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 96-109.

107. Hosseinimehr S. J. Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides: considerations for targeting peptide conjugate design / S. J. Hosseinimehr, V. Tolmachev, A. Orlova // *Drug Discovery Today*. – 2012. – Vol. 17, № 21-22. – P. 1224-1232.

108. Hughes B. Antibody–drug conjugates for cancer: poised to deliver? / B. Hughes // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2010. – Vol. 9, № 9. – P. 665-667.

109. Human epidermal growth factor receptor 2: a significant indicator for predicting progression in non-muscle-invasive bladder cancer especially in high-risk groups / W. Ding, S. Tong, Y. Gou [et al.] // *World Journal of Urology*. – 2015. – Vol. 33, № 12. – P. 1951-1957.

110. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) PET imaging of her2-low breast cancer with [<sup>68</sup>Ga]Ga-ABY-025: Results from a Pilot Study / R. Altena, S. A. Burén, A. Blomgren [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. – 2024. – Vol. 65, № 5. – P. 700-707.

111. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–targeting [<sup>68</sup>Ga]Ga-ABY-025 PET/CT Predicts Early Metabolic Response in Metastatic Breast Cancer / A. Alhuseinalkhudhur, H. Lindman, P. Liss [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2023. – Vol. 64, № 9. – P. 1364-1370.

112. Imaging of EGFR expression in murine xenografts using site-specifically labelled anti-EGFR <sup>111</sup>In-DOTA-Z EGFR:2377 Affibody molecule: aspect of the injected tracer amount / V. Tolmachev, D. Rosik, H. Wällberg [et al.] // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. – 2010. – Vol. 37, № 3. – P. 613-622.

113. Imaging of insulinlike growth factor type 1 receptor in prostate cancer xenografts using the affibody molecule <sup>111</sup>In-DOTA-ZIGF1R:4551 / V. Tolmachev,

J. Malmberg, C. Hofström [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine.* – 2012. – Vol. 53, № 1. – P. 90-97.

114. Imaging of platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  expression in glioblastoma xenografts using affibody molecule  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Z09591 / V. Tolmachev, Z. Varasteh, H. Honarvar [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine.* – 2014. – Vol. 55, № 2. – P. 294-300.

115. Imaging tumors with an albumin-binding Fab, a novel tumor-targeting agent / M. S. Dennis, H. Jin, D. Dugger [et al.] // *Cancer Research.* – 2007. – Vol. 67, № 1. – P. 254-261.

116. Imaging using radiolabelled targeted proteins: radioimmunodetection and beyond / J. Garousi, A. Orlova, F. Y. Frejd, V. Tolmachev // *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry.* – 2020. – Vol. 5. – P. 16.

117. Impact of  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-MAL-MZHER2 PET imaging in advanced gastric cancer patients and therapeutic response monitoring / N. Zhou, C. Liu, X. Guo [et al.] // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* – 2021. – Vol. 48, № 1. – P. 161-175.

118. Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology / B. M. Tijink, T. Laeremans, M. Budde [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics.* – 2008. – Vol. 7. – Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding. – № 8. – P. 2288-2297.

119. In vivo imaging of the Programmed Death Ligand 1 by  $^{18}\text{F}$  PET / D. E. González Trotter, X. Meng, P. McQuade [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine.* – 2017. – Vol. 58, № 11. – P. 1852-1857.

120. In vivo neutralization of colchicine toxicity by a PASylated anticalin in a rat model / E. Jerschke, M. Barkovsky, N. Jung [et al.] // *Toxicology.* – 2023. – Vol. 492. – P. 153526.

121. Incorporation of a hydrophilic spacer reduces hepatic uptake of HER2-targeting affibody–DM1 drug conjugates / H. Ding, M. Altai, S. S. Rinne [et al.] // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11, № 8. – P. 1168.

122. Indini A. Trastuzumab deruxtecan: changing the destiny of her2 expressing solid tumors / A. Indini, E. Rijavec, F. Grossi // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 9. – P. 4774.

123. Influence of molecular design on biodistribution and targeting properties of an Affibody-fused HER2-recognising anticancer toxin / M. Altai, H. Liu, A. Orlova [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2016. – Vol. 49, № 3. – P. 1185-1194.

124. Influence of molecular design on the targeting properties of ABD-fused mono- and bi-valent anti-HER3 affibody therapeutic constructs / M. Altai, C. D. Leitao, S. S. Rinne [et al.] // *Cells*. – 2018. – Vol. 7, № 10. – P. 164.

125. Influence of size and charge of unstructured polypeptides on pharmacokinetics and biodistribution of targeted fusion proteins / F. Brandl, H. Merten, M. Zimmermann [et al.] // *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. – 2019. – Vol. 307. – P. 379-392.

126. Intra-image referencing for simplified assessment of HER2-expression in breast cancer metastases using the Affibody molecule ABY-025 with PET and SPECT / D. Sandberg, V. Tolmachev, I. Velikyan [et al.] // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. – 2017. – Vol. 44, № 8. – P. 1337-1346.

127. Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications / N. Iqbal, N. Iqbal // *Molecular Biology International*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 852748.

128. Keam S. J. Trastuzumab deruxtecan: first approval / S. J. Keam // *Drugs*. – 2020. – Vol. 80. – Trastuzumab Deruxtecan. – № 5. – P. 501-508.

129. Kontermann, Roland E. Half-life extended biotherapeutics / Kontermann, Roland E. – Vol. 16. – № 7. – P. 903-915.

130. Kurien B. T. Western blotting: methods for analyzing cytokines / B. T. Kurien, R. H. Scofield // *Methods*. – 2006. – Vol. 38, № 4. – P. 283-293.

131. Lal R. A. Perspectives on long-acting growth hormone therapy in children and adults / R. A. Lal, A. R. Hoffman // *Archives of Endocrinology and Metabolism*. – 2019. – Vol. 63, № 6. – P. 601-607.

132. LBA15 Primary outcome of the phase III SYD985.002/TULIP trial comparing [vic-]trastuzumab duocarmazine to physician's choice treatment in patients with pre-treated HER2-positive locally advanced or metastatic breast cancer / C. S. Manich, J. O'Shaughnessy, P. G. Aftimos [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2021. – Vol. 32. – P. S1288.

133. Long-term strategies for poorly water-soluble peptides: combining fatty acid modification with PAS fusion / H. Zhu, H. Hua, Y. Dong [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2023. – Vol. 34, № 12. – P. 2366-2374.

134. McCombs J. R. Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry / J. R. McCombs, S. C. Owen // *The AAPS Journal*. – 2015. – Vol. 17, № 2. – P. 339-351.

135. Measuring HER2-Receptor expression in metastatic breast cancer using [<sup>68</sup>Ga]ABY-025 Affibody PET/CT / J. Sörensen, I. Velikyan, D. Sandberg [et al.] // *Theranostics*. – 2016. – Vol. 6, № 2. – P. 262-271.

136. Mechanisms of resistance to antibody-drug conjugates / R. Khoury, K. Saleh, N. Khalife [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 11. – P. 9674.

137. Molecular design, expression and evaluation of PASylated human recombinant erythropoietin with enhanced functional properties / M. H. Hedayati, D. Norouzian, M. Aminian [et al.] // *The Protein Journal*. – 2017. – Vol. 36, № 1. – P. 36-48.

138. Molecular design of <sup>68</sup>Ga- and <sup>89</sup>Zr-labeled anticalin radioligands for PET-imaging of PSMA-positive tumors / V. Morath, C. Brandt, F.-C. Deuschle [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 20, № 5. – P. 2490-2501.

139. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic  $^{111}\text{In}$ - or  $^{68}\text{Ga}$ -labeled affibody molecules / R. P. Baum, V. Prasad, D. Müller [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine.* – 2010. – Vol. 51, № 6. – P. 892-897.

140. Neoadjuvant trastuzumab, pertuzumab, and chemotherapy versus trastuzumab emtansine plus pertuzumab in patients with HER2-positive breast cancer (KRISTINE): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial / S. A. Hurvitz, M. Martin, W. F. Symmans [et al.] // *The Lancet. Oncology.* – 2018. – Vol. 19. – Neoadjuvant trastuzumab, pertuzumab, and chemotherapy versus trastuzumab emtansine plus pertuzumab in patients with HER2-positive breast cancer (KRISTINE). – № 1. – P. 115-126.

141. Nolting B. Linker technologies for antibody-drug conjugates / B. Nolting // *Methods in Molecular Biology.* – 2013. – Vol. 1045. – P. 71-100.

142. Oh D.-Y. HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer / D.-Y. Oh, Y.-J. Bang // *Nature Reviews Clinical Oncology.* – 2020. – Vol. 17, № 1. – P. 33-48.

143. Oncogenic signals of HER-2/neu in regulating the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 / H. Y. Yang, B. P. Zhou, M. C. Hung, M. H. Lee // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2000. – Vol. 275, № 32. – P. 24735-24739.

144. Papagiannopoulou D. Technetium-99m radiochemistry for pharmaceutical applications / D. Papagiannopoulou // *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals.* – 2017. – Vol. 60, № 11. – P. 502-520.

145. PASylated interferon  $\alpha$  efficiently suppresses hepatitis B virus and induces anti-HBs seroconversion in HBV-transgenic mice / Y. Xia, M. Schlapschy, V. Morath [et al.] // *Antiviral Research.* – 2019. – Vol. 161. – P. 134-143.

146. PASylated urate oxidase enzyme: enhancing biocatalytic activity, physicochemical properties, and plasma half-life / A. Najjari, H. Shahbazmohammadi, S. A. Nojoumi, E. Omidinia // *ACS omega.* – 2022. – Vol. 7, № 50. – P. 46118-46130.

147. PASylation of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) retains IL-1 blockade and extends its duration in mouse urate crystal-induced peritonitis / N. E. Powers, B. Swartzwelter, C. Marchetti [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295, № 3. – P. 868-882.

148. PASylation of murine leptin leads to extended plasma half-life and enhanced in vivo efficacy / V. Morath, F. Bolze, M. Schlapschy [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2015. – Vol. 12, № 5. – P. 1431-1442.

149. Peptide chemistry toolbox - Transforming natural peptides into peptide therapeutics / M. Erak, K. Bellmann-Sickert, S. Els-Heindl, A. G. Beck-Sickinger // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 26, № 10. – P. 2759-2765.

150. Phase 2 study of CT-322, a targeted biologic inhibitor of VEGFR-2 based on a domain of human fibronectin, in recurrent glioblastoma / D. Schiff, S. Kesari, J. de Groot [et al.] // *Investigational New Drugs*. – 2015. – Vol. 33, № 1. – P. 247-253.

151. Phase I and pharmacokinetic study of CT-322 (BMS-844203), a targeted Adnectin inhibitor of VEGFR-2 based on a domain of human fibronectin / A. W. Tolcher, C. J. Sweeney, K. Papadopoulos [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2011. – Vol. 17, № 2. – P. 363-371.

152. Phase I clinical evaluation of <sup>99m</sup>Tc-labeled Affibody molecule for imaging HER2 expression in breast cancer / O. Bragina, V. Chernov, M. Larkina [et al.] // *Theranostics*. – 2023. – Vol. 13, № 14. – P. 4858-4871.

153. Potent and specific fusion toxins consisting of a HER2-binding, ABD-derived affinity protein, fused to truncated versions of Pseudomonas exotoxin A / H. Liu, S. Lindbo, H. Ding [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2019. – Vol. 55, № 1. – P. 309-319.

154. Potential drugs used in the antibody-drug conjugate (ADC) architecture for cancer therapy / S. Yaghoubi, M. H. Karimi, M. Lotfinia [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2020. – Vol. 235, № 1. – P. 31-64.

155. Preclinical evaluation of HER2-Targeting DARPin G3: impact of Albumin-Binding Domain (ABD) fusion / S. M. Deyev, M. Oroujeni, J. Garousi [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 8. – P. 4246.

156. Preclinical evaluation of the GRPR-targeting antagonist RM26 conjugated to the albumin-binding domain for GRPR-targeting therapy of cancer / A. Abouzayed, H. Tano, Á. Nagy [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12, № 10. – P. 977.

157. Proline/alanine-rich sequence (PAS) polypeptides as an alternative to PEG precipitants for protein crystallization / A. Schiefner, R. Walser, M. Gebauer, A. Skerra // *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*. – 2020. – Vol. 76, № 7. – P. 320-325.

158. Protein interactions with HER-family receptors can have different characteristics depending on the hosting cell line / P. Barta, J. Malmberg, L. Melicharova [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2012. – Vol. 40, № 5. – P. 1677-1682.

159. Protein PEGylation for cancer therapy: bench to bedside / V. Gupta, S. Bhavanasi, M. Quadir [et al.] // *Journal of Cell Communication and Signaling*. – 2019. – Vol. 13, № 3. – P. 319-330.

160. Radionuclide imaging of VEGFR2 in glioma vasculature using biparatopic affibody conjugate: proof-of-principle in a murine model / B. Mitran, R. Güler, F. P. Roche [et al.] // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8, № 16. – P. 4462-4476.

161. Radionuclide Therapy of HER2-Expressing Xenografts Using [<sup>177</sup>Lu]Lu-ABY-027 Affibody Molecule Alone and in Combination with Trastuzumab / Y. Liu, T. Xu, A. Vorobyeva [et al.] // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15, № 9. – P. 2409.

162. Radionuclide Therapy of HER2-Positive Microxenografts Using a <sup>177</sup>Lu-Labeled HER2-Specific Affibody Molecule / V. Tolmachev, A. Orlova, R. Pehrson [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, № 6. – P. 2773-2782.

163. Radionuclide therapy using ABD-fused ADAPT scaffold protein: proof of principle / J. Garousi, E. von Witting, J. Borin [et al.] // *Biomaterials*. – 2021. – Vol. 266. – P. 120381.

164. Real-time characterization of antibody binding to receptors on living immune cells / S. Bondza, E. Foy, J. Brooks [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 455.

165. Role of ErbB Receptors in cancer cell migration and invasion / A. Appert-Collin, P. Hubert, G. Crémel, A. Bennasroune // *Frontiers in Pharmacology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 283.

166. Same-day imaging using small proteins: clinical experience and translational prospects in oncology / A. Krasniqi, M. D'Huyvetter, N. Devoogdt [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2018. – Vol. 59, № 6. – P. 885-891.

167. Sheyi R. Linkers: an assurance for controlled delivery of antibody-drug conjugate / R. Sheyi, B. G. de la Torre, F. Albericio // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, № 2. – P. 396.

168. Simeon R. In vitro-engineered non-antibody protein therapeutics / R. Simeon, Z. Chen // *Protein & Cell*. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 3-14.

169. Site-specific radiometal labeling and improved biodistribution using ABY-027, a novel HER2-targeting affibody molecule-albumin-binding domain fusion protein / A. Orlova, A. Jonsson, D. Rosik [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. – 2013. – Vol. 54, № 6. – P. 961-968.

170. Sleep D. Albumin as a versatile platform for drug half-life extension / D. Sleep, J. Cameron, L. R. Evans // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2013. – Vol. 1830, № 12. – P. 5526-5534.

171. Spradau T. W. Protein and peptide labeling with (cyclopentadienyl)tricarbonyl rhenium and technetium / T. W. Spradau, J. A. Katzenellenbogen // *Bioconjugate Chemistry*. – 1998. – Vol. 9, № 6. – P. 765-772.

172. Stepping forward in antibody-drug conjugate development / Y. Jin, M. A. Schladetsch, X. Huang [et al.] // *Pharmacology & therapeutics*. – 2022. – Vol. 229. – P. 107917.

173. Stork R. A novel tri-functional antibody fusion protein with improved pharmacokinetic properties generated by fusing a bispecific single-chain diabody with an albumin-binding domain from streptococcal protein G / R. Stork, D. Müller, R. E. Kontermann // *Protein engineering, design & selection: PEDS*. – 2007. – Vol. 20, № 11. – P. 569-576.

174. Structural basis for high-affinity HER2 receptor binding by an engineered protein / C. Eigenbrot, M. Ultsch, A. Dubnovitsky [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, № 34. – P. 15039-15044.

175. Structural basis of activity of HER2-targeting construct composed of DARPin G3 and albumin-binding domains / A. G. Konshina, E. V. Bocharov, E. V. Konovalova [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 21. – P. 11370.

176. Swain S. M. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions / S. M. Swain, M. Shastry, E. Hamilton // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2023. – Vol. 22, № 2. – P. 101-126.

177. Tai W. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery / W. Tai, R. Mahato, K. Cheng // *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. – 2010. – Vol. 146, № 3. – P. 264-275.

178. Targeting HER2 expressing tumors with a potent drug conjugate based on an albumin binding domain-derived affinity protein / J. Garousi, H. Ding, E. von Witting [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, № 11. – P. 1847.

179. Targeting HER2 in colorectal cancer: the landscape of amplification and short variant mutations in ERBB2 and ERBB3 / J. S. Ross, M. Fakih, S. M. Ali [et al.] // *Cancer*. – 2018. – Vol. 124, № 7. – P. 1358-1373.

180. Targeting of HER2-expressing tumors using <sup>111</sup>In-ABY-025, a second-generation affibody molecule with a fundamentally reengineered scaffold / S.

Ahlgren, A. Orlova, H. Wällberg [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2010. – Vol. 51, № 7. – P. 1131-1138.

181. Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells / V. H. van Der Velden, J. G. te Marvelde, P. G. Hoogeveen [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 97, № 10. – P. 3197-3204.

182. Target-specific cytotoxic effects on HER2-expressing cells by the tripartite fusion toxin ZHER2:2891-ABD-PE38X8, including a targeting affibody molecule and a half-life extension domain / H. Liu, J. Seijsing, F. Y. Frejd [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2015. – Vol. 47, № 2. – P. 601-609.

183. The Anti-BCMA antibody-drug conjugate HDP-101 with a novel amanitin payload shows promising data in relapsed/refractory multiple myeloma in a Phase 1/2a clinical trial as it advances into cohort 7 / H. Szaboki, J. Kaufman, S. Richard [et al.] // *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. – 2025. – Vol. 25. – P. S40.

184. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors / T. P. J. Garrett, N. M. McKern, M. Lou [et al.] // *Molecular Cell*. – 2003. – Vol. 11, № 2. – P. 495-505.

185. The dual targeting of FcRn and FcγRs via monomeric Fc fragments results in strong inhibition of IgG-dependent autoimmune pathologies / C. Monnet, E. Jacque, C. de Romeuf [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 728322.

186. The effects of affinity and valency of an albumin-binding domain (ABD) on the half-life of a single-chain diabody-ABD fusion protein / J. Hopp, N. Hornig, K. A. Zettlitz [et al.] // *Protein engineering, design & selection: PEDS*. – 2010. – Vol. 23, № 11. – P. 827-834.

187. The HERPET study: imaging HER2 expression in breast cancer with the novel PET tracer [<sup>18</sup>F]GE-226, a first-in-patient study. / L. M. Kenny, F. J. Gilbert,

G. Gopalakrishnan [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 23, № 11. – P. 827-834.

188. The influence of domain permutations of an albumin-binding domain-fused HER2-Targeting affibody-based drug conjugate on tumor cell proliferation and therapy efficacy / W. Yin, T. Xu, M. Altai [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, № 11. – P. 1974.

189. The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin / A. Nguyen, A. E. Reyes, M. Zhang [et al.] // *Protein engineering, design & selection: PEDS*. – 2006. – Vol. 19, № 7. – P. 291-297.

190. The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies / H. Luo, X. Xu, M. Ye [et al.] // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13, № 1. – P. e0191972.

191. The role of human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis of published data / L. Liu, X. Shao, W. Gao [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. – 2010. – Vol. 5, № 12. – P. 1922-1932.

192. The therapeutic age of the neonatal Fc receptor / M. Pyzik, L. K. Kozicky, A. K. Gandhi, R. S. Blumberg // *Nature Reviews. Immunology*. – 2023. – P. 1-18.

193. Thurber G. M. Factors determining antibody distribution in tumors / G. M. Thurber, M. M. Schmidt, K. D. Wittrup // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2008. – Vol. 29, № 2. – P. 57-61.

194. Tolmachev V. Affibody molecules as targeting vectors for PET Imaging / V. Tolmachev, A. Orlova // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, № 3. – P. 651.

195. Trastuzumab deruxtecan in breast cancer / M. Martín, A. Pandiella, E. Vargas-Castrillón [et al.] // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2024. – Vol. 198. – P. 104355.

196. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer / S. Modi, C. Saura, T. Yamashita [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382, № 7. – P. 610-621.

197. Trastuzumab deruxtecan versus trastuzumab emtansine in HER2-positive metastatic breast cancer patients with brain metastases from the randomized DESTINY-Breast03 trial / S. A. Hurvitz, S.-B. Kim, W.-P. Chung [et al.] // *ESMO open*. – 2024. – Vol. 9, № 5. – P. 102924.

198. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer / S. Verma, D. Miles, L. Gianni [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2012. – Vol. 367, № 19. – P. 1783-1791.

199. Trastuzumab emtansine for residual invasive her2-positive breast cancer / G. von Minckwitz, C.-S. Huang, M. S. Mano [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2019. – Vol. 380, № 7. – P. 617-628.

200. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial / I. E. Krop, S.-B. Kim, A. G. Martin [et al.] // *The Lancet. Oncology*. – 2017. – Vol. 18, № 6. – P. 743-754.

201. Trastuzumab Emtansine with or without pertuzumab versus trastuzumab plus taxane for human epidermal growth factor receptor 2-positive, advanced breast cancer: primary results from the Phase III MARIANNE study / E. A. Perez, C. Barrios, W. Eiermann [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 35, № 2. – P. 141-148.

202. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial / Y.-J. Bang, E. Van Cutsem, A. Feyereislova [et al.] // *Lancet*. – 2010. – Vol. 376, № 9742. – P. 687-697.

203. Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule / A. Orlova, M. Magnusson, T. L. J. Eriksson [et al.] // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, № 8. – P. 4339-4348.

204. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 / D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2001. – Vol. 344, № 11. – P. 783-792.

205. Uversky V. N. What does it mean to be natively unfolded? / V. N. Uversky // *European Journal of Biochemistry*. – 2002. – Vol. 269, № 1. – P. 2-12.

206. Wällberg H. Slow internalization of anti-HER2 synthetic affibody monomer <sup>111</sup>In-DOTA-ZHER2:342-pep2: implications for development of labeled tracers / H. Wällberg, A. Orlova // *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. – 2008. – Vol. 23, № 4. – P. 435-442.

207. Zanzonico P. Principles of nuclear medicine imaging: planar, SPECT, PET, multi-modality, and autoradiography systems / P. Zanzonico // *Radiation Research*. – 2012. – Vol. 177, № 4. – P. 349-364.

208. Zorzi A. Non-covalent albumin-binding ligands for extending the circulating half-life of small biotherapeutics / A. Zorzi, S. Linciano, A. Angelini // *MedChemComm*. – 2019. – Vol. 10, № 7. – P. 1068-1081.

209. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics / T. Rath, K. Baker, J. A. Dumont [et al.] // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2015. – Т. 35. – Fc-fusion proteins and FcRn. – № 2. – С. 235-254.

210. Russia's mRNA Breakthrough: A Game Changer in the Fight against Cancer. – URL: <https://www.linkedin.com/pulse/russias-mrna-breakthrough-game-changer-fight-against-cancer-xjjsf> (дата обращения: 18.03.2026). – Текст : электронный.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

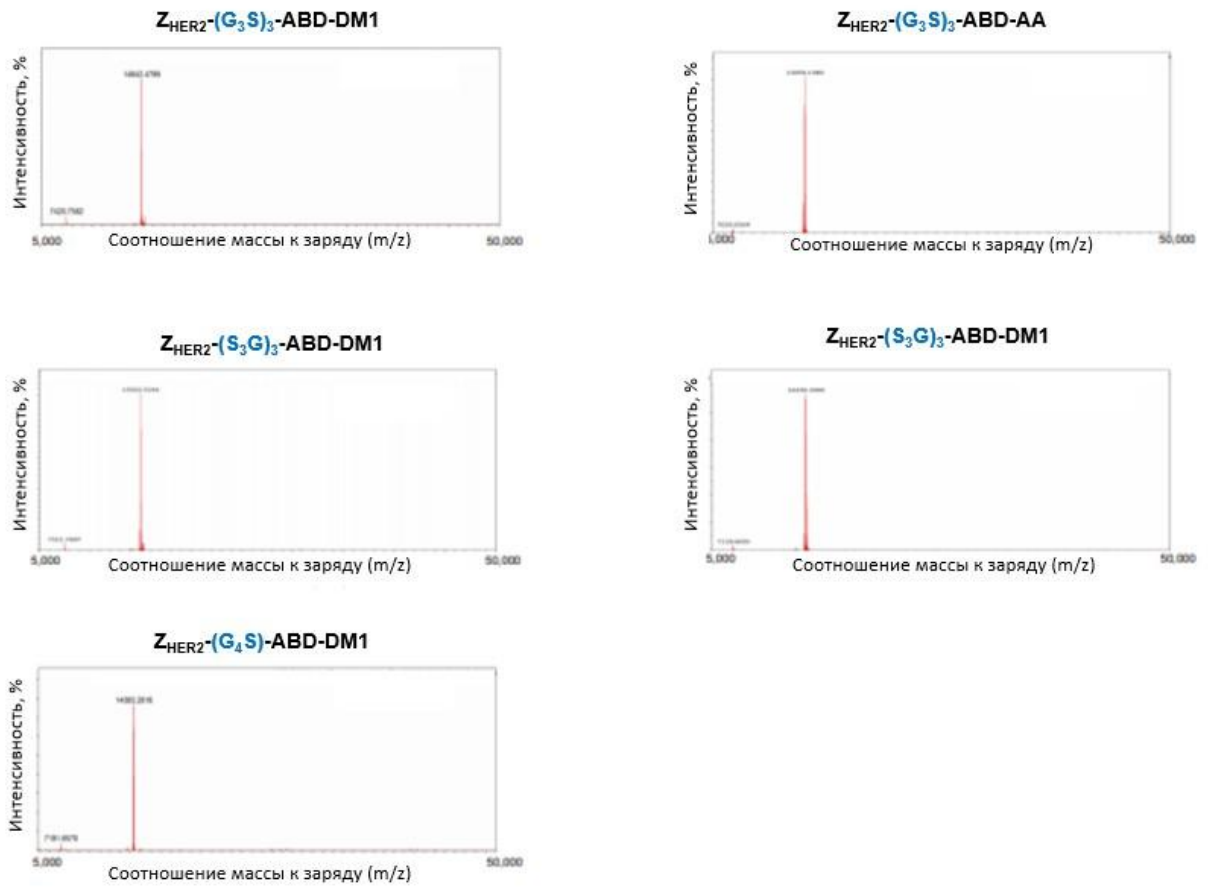


Рисунок А.1 – Результаты анализа методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров:  $Z_{HER2}-(G_3S)_3-ABD-DM1$ ,  $Z_{HER2}-(S_3G)_3-ABD-DM1$ ,  $Z_{HER2}-G_4S-ABD-DM1$ ,  $Z_{HER2}-(G_3S)_3-ABD-AA$ ,  $Z_{HER2}-(S_3G)_3-ABD-AA$

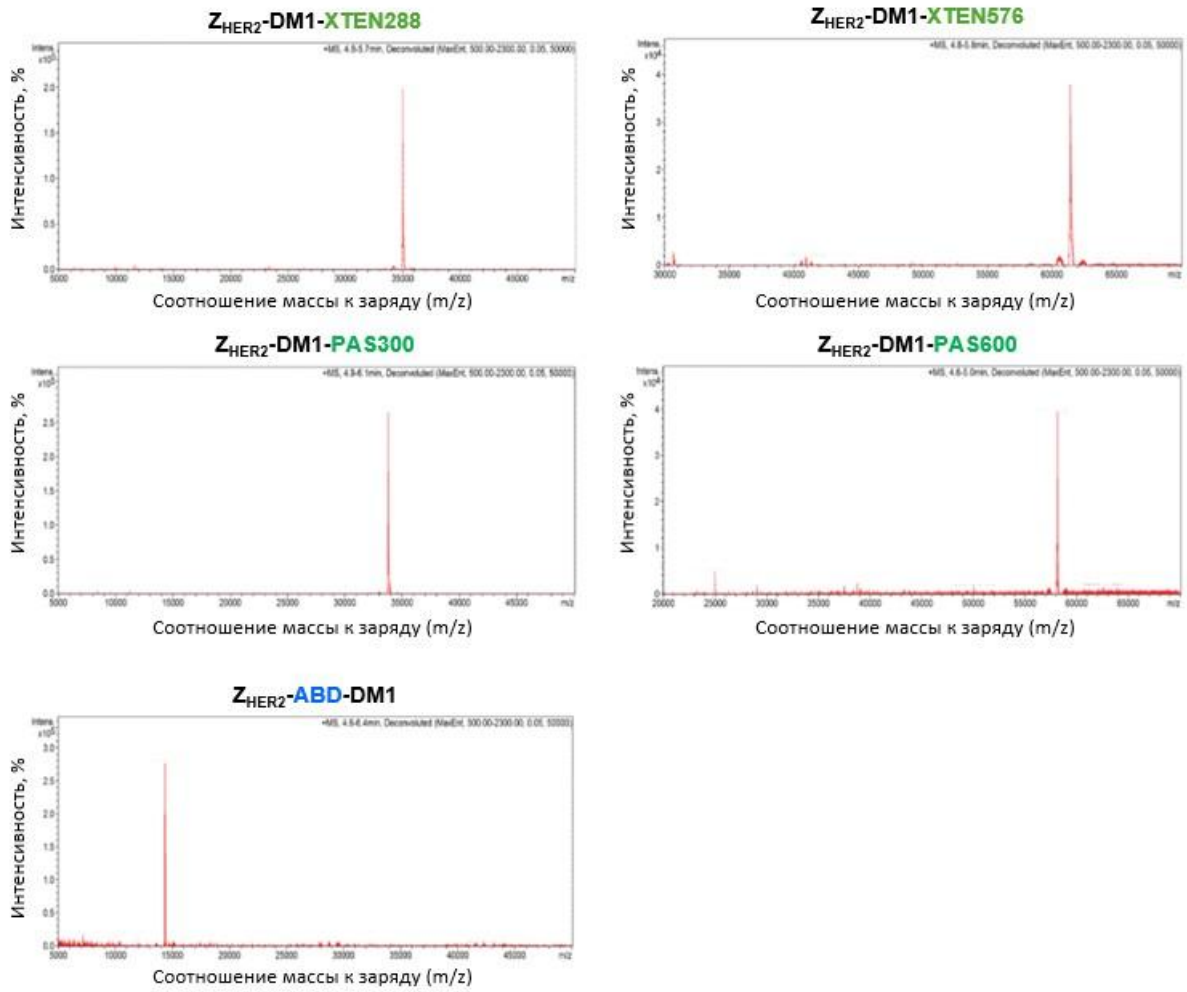


Рисунок А.2 – Результаты анализа методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения: Z<sub>HER2</sub>-DM1-XTEN288, Z<sub>HER2</sub>-DM1-XTEN576, Z<sub>HER2</sub>-DM1-PAS300, Z<sub>HER2</sub>-DM1-PAS600 и Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-ABD-DM1

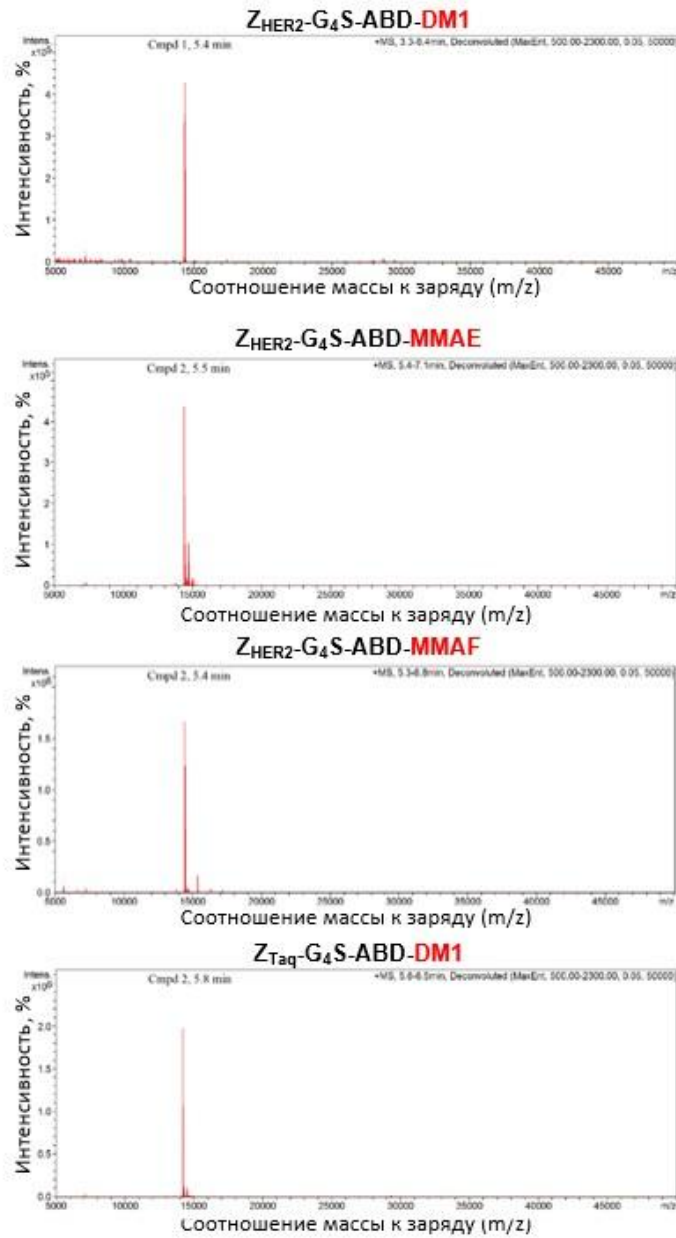


Рисунок А.3 – Результаты анализа методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами:  $Z_{HER2}\text{-}ABD\text{-DM1}$ ,  $Z_{HER2}\text{-}ABD\text{-MMAE}$ ,  $Z_{HER2}\text{-}ABD\text{-MMAF}$  и нецелевой контрольной конструкции  $Z_{Taq}\text{-}ABD\text{-MMAF}$

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров –  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-(\text{G}_3\text{S})_3\text{-ABD-DM1}$ ,  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-(\text{S}_3\text{G})_3\text{-ABD-DM1}$ ,  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-\text{G}_4\text{S-ABD-DM1}$  – в мышцах NMRI через 4, 24 и 48 ч после инъекции

Орган	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-(\text{G}_3\text{S})_3\text{-ABD-DM1}$			$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-(\text{S}_3\text{G})_3\text{-ABD-DM1}$			$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-\text{G}_4\text{S-ABD-DM1}$		
	4 ч	24 ч	48 ч	4 ч	24 ч	48 ч	4 ч	24 ч	48 ч
Кровь	11 ± 1	4,5 ± 0,6	2,7 ± 0,3 <sup>a,б</sup>	11 ± 2	3,9 ± 0,4	2,2 ± 0,2 <sup>a,е</sup>	11,1 ± 0,1	3,9 ± 0,6	1,8 ± 0,1 <sup>б,е</sup>
Слюнные железы	1,9 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1 <sup>б</sup>	2,0 ± 0,4	1,3 ± 0,1	0,95 ± 0,05 <sup>е</sup>	2,3 ± 0,8	1,4 ± 0,3	0,82 ± 0,09 <sup>б,е</sup>
Легкие	4,1 ± 0,8	2,1 ± 0,3	1,6 ± 0,1 <sup>б</sup>	4,2 ± 0,7	2,0 ± 0,2	1,4 ± 0,1 <sup>е</sup>	4,3 ± 0,7	2,0 ± 0,4	1,07 ± 0,04 <sup>б,е</sup>
Печень	4,0 ± 0,7 <sup>б</sup>	2,8 ± 0,3	2,4 ± 0,3	4,5 ± 0,8 <sup>е</sup>	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,2	5,8 ± 0,2 <sup>б,е</sup>	3,5 ± 0,7	2,2 ± 0,2
Селезенка	2,1 ± 0,6	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,3 <sup>б</sup>	2,5 ± 0,4	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2 <sup>е</sup>	2,5 ± 0,3	1,8 ± 0,5	1,1 ± 0,1 <sup>б,е</sup>
Желудок	1,5 ± 0,2 <sup>б</sup>	1,0 ± 0,2	0,65 ± 0,06 <sup>б</sup>	1,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,65 ± 0,08 <sup>е</sup>	2,2 ± 0,3 <sup>б</sup>	1,0 ± 0,2	0,54 ± 0,04 <sup>б,е</sup>
Почки	89 ± 13	44 ± 5	20 ± 2	86 ± 15	36 ± 2	24 ± 2 <sup>е</sup>	94 ± 10	37 ± 8	19 ± 1 <sup>е</sup>
Мышцы	0,73 ± 0,03	0,7 ± 0,1	0,48 ± 0,03 <sup>б</sup>	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,45 ± 0,04 <sup>е</sup>	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,36 ± 0,03 <sup>б,е</sup>
Кости	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,13 ± 0,04	1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,18 ± 0,09 <sup>е</sup>	2,0 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,1 <sup>е</sup>
Остаток ЖКТ*	4,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,3	2,1 ± 0,5	10 ± 4 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,4	1,9 ± 0,1	19 ± 13	3,0 ± 0,4	1,6 ± 0,3
Тело*	22 ± 3	18 ± 2	13 ± 1 <sup>б</sup>	22 ± 2	16 ± 2	13 ± 1 <sup>е</sup>	23 ± 3	17 ± 2	11 ± 1 <sup>б,е</sup>

Примечание: <sup>a</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-(\text{G}_3\text{S})_3\text{-ABD-DM1}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-(\text{S}_3\text{G})_3\text{-ABD-DM1}$  (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);  
<sup>б</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-(\text{G}_3\text{S})_3\text{-ABD-DM1}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-\text{G}_4\text{S-ABD-DM1}$  (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);  
<sup>е</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-(\text{S}_3\text{G})_3\text{-ABD-DM1}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}-\text{G}_4\text{S-ABD-DM1}$  (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);  
\* – данные представлены в виде % ВД на весь образец.

Таблица Б.2 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения в мышцах CD1 через 4, 24 и 48 ч после инъекции

Орган	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN288}$			$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-XTEN576}$			$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS300}$			$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-DM1-PAS600}$			$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-ABD-DM1}$		
	4 ч	24 ч	48 ч	4 ч	24 ч	48 ч	4 ч	24 ч	48 ч	4 ч	24 ч	48 ч	4 ч	24 ч	48 ч
Кровь	$10 \pm 2^{a, в}$	$2,5 \pm 0,5^{a, в, г}$	$1,2 \pm 0,3$	$22,0 \pm 0,5^{a, д, ж}$	$6,1 \pm 0,4^{a, д, е, ж}$	$2,6 \pm 0,2$	$11 \pm 2^{д, з}$	$2,4 \pm 0,3^{д, з, и}$	$1,0 \pm 0,4$	$22 \pm 2^{b, з, к}$	$7,4 \pm 0,5^{b, е, з, к}$	$2,7 \pm 0,5$	$10,9 \pm 0,9^{ж, к}$	$4,3 \pm 0,2^{г, ж, и, к}$	$2,8 \pm 0,6$
Легкие	$3,6 \pm 0,8^{a, в}$	$1,2 \pm 0,2^{a, в, г}$	$0,7 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,9^{a, д, ж}$	$2,2 \pm 0,3^{a, д, е}$	$1,3 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,8^{д, з}$	$1,3 \pm 0,2^{д, з, и}$	$0,6 \pm 0,1$	$7 \pm 1^{b, з, к}$	$3,2 \pm 0,3^{b, е, з, к}$	$1,3 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,3^{ж, к}$	$2,5 \pm 0,3^{г, и, к}$	$2,0 \pm 0,4$
Печень	$5 \pm 1$	$2,9 \pm 0,27^г$	$2,3 \pm 0,4$	$6,3 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,8$	$6 \pm 1$	$4,7 \pm 0,7^г$	$3,3 \pm 0,4$
Селезенка	$2,9 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,7^{b, г}$	$1,8 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,4^b$	$1,8 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,5^г$	$2,2 \pm 0,3$
Тонкий кишечник	$2,1 \pm 0,8^{a, в}$	$1,0 \pm 0,4^{a, в}$	$0,4 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,5^{a, д, ж}$	$2,0 \pm 0,4^{a, д}$	$1,4 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,3^{д, з}$	$1,0 \pm 0,1^{д, з, и}$	$0,4 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,2^{b, з, к}$	$2,3 \pm 0,2^{b, з}$	$1,2 \pm 0,05$	$1,7 \pm 0,4^{ж, к}$	$1,6 \pm 0,3^и$	$0,9 \pm 0,2$
Поджелудочная железа	$2,6 \pm 0,6$	$0,6 \pm 0,1^{a, в, г}$	$0,5 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,2^a$	$0,8 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,2^з$	$0,5 \pm 0,2$	$4 \pm 1$	$1,6 \pm 0,2^{b, з}$	$0,7 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,3^г$	$1,1 \pm 0,5$
Почки	$83 \pm 3^{a, в}$	$50 \pm 7^{a, в}$	$34 \pm 7$	$32 \pm 2^{a, д, ж}$	$28 \pm 5^{a, д, ж}$	$23 \pm 4$	$74 \pm 15^{b, д, з, и}$	$52 \pm 5^{д, з}$	$27 \pm 3$	$26 \pm 3^{b, з, к}$	$37 \pm 2^{b, з, к}$	$22 \pm 2$	$98 \pm 3^{ж, и, к}$	$57 \pm 7^{ж, к}$	$39,9 \pm 9,9$
Мышцы	$0,8 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1^{b, г}$	$0,2 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,03^{з, и}$	$0,2 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,05^{b, з}$	$0,4 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1^{г, и}$	$0,5 \pm 0,1$
Кость	$1,8 \pm 0,4^г$	$0,7 \pm 0,1^г$	$0,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,2^{ж}$	$0,7 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1^и$	$0,6 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3^к$	$0,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,4^г$	$2,3 \pm 0,5^{г, ж, и, к}$	$2,1 \pm 0,2$
ЖКТ	$6,5 \pm 1,6$	$1,8 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,8$	$3,4 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,8$	$4,5 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,8$	$3,1 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,5$
Тело	$22 \pm 3$	$9,0 \pm 0,8$	$4,8 \pm 0,7$	$36 \pm 3$	$17 \pm 1$	$11,5 \pm 0,8$	$26 \pm 1$	$10 \pm 1$	$4,9 \pm 0,4$	$35 \pm 4$	$21 \pm 1$	$12 \pm 1$	$24 \pm 2$	$19 \pm 1$	$14,1 \pm 2,1$

## Продолжение Таблицы Б.2

Примечание: <sup>a</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN288** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN576** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>b</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN288** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS300** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>c</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN288** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS600** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>d</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN288** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD**-DM1 (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>e</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN576** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS300** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>f</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN576** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS600** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>ж</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN576** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD**-DM1 (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>з</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS300** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS600** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>и</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS300** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD**-DM1 (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>к</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS600** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD**-DM1 (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

\* – данные представлены в виде % ВД на весь образец.

Таблица Б.3 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения в мышцах линии BALB/В nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3 через 48 ч после инъекции

Орган	[ <sup>99m</sup> Tc]Tc-Z <sub>HER2</sub> -DM1- <b>XTEN288</b>	[ <sup>99m</sup> Tc]Tc-Z <sub>HER2</sub> -DM1- <b>XTEN576</b>	[ <sup>99m</sup> Tc]Tc-Z <sub>HER2</sub> -DM1- <b>PAS300</b>	[ <sup>99m</sup> Tc]Tc-Z <sub>HER2</sub> -DM1- <b>PAS600</b>	[ <sup>99m</sup> Tc]Tc-Z <sub>HER2</sub> - <b>ABD-DM1</b>
Кровь	0,96 ± 0,1 <sup>а, в, г</sup>	4,4 ± 0,3 <sup>а, д, ж</sup>	1,08 ± 0,08 <sup>д, з, и</sup>	4,3 ± 0,5 <sup>в, з, к</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>г, ж, и, к</sup>
Легкие	0,53 ± 0,05 <sup>а, в</sup>	1,65 ± 0,2 <sup>а, д</sup>	0,64 ± 0,2 <sup>д, з, и</sup>	1,82 ± 0,28 <sup>в, з</sup>	1,50 ± 0,26 <sup>и</sup>
Печень	1,66 ± 0,2 <sup>а, б, в, г</sup>	2,88 ± 0,3 <sup>а, е, ж</sup>	3,25 ± 0,2 <sup>б</sup>	3,61 ± 0,2 <sup>е</sup>	3,87 ± 0,53 <sup>г, ж</sup>
Селезенка	1,08 ± 0,1 <sup>а, б, в</sup>	2,47 ± 0,4 <sup>а, е, ж</sup>	2,29 ± 0,2 <sup>б, з, и</sup>	3,11 ± 0,3 <sup>в, е, з, к</sup>	1,60 ± 0,23 <sup>ж, и, к</sup>
Тонкий кишечник	0,34 ± 0,02 <sup>б, в</sup>	0,81 ± 0,1 <sup>е</sup>	1,25 ± 0,4 <sup>б, з</sup>	2,2 ± 0,4 <sup>в, е, з, к</sup>	0,68 ± 0,09 <sup>к</sup>
Поджелудочная железа	0,30 ± 0,02 <sup>а, в</sup>	1,08 ± 0,09 <sup>а, д, ж</sup>	0,40 ± 0,02 <sup>д, з</sup>	1,07 ± 0,1 <sup>в, з, к</sup>	0,46 ± 0,07 <sup>ж, к</sup>
Почки	36 ± 5 <sup>а, б, в, г</sup>	23 ± 2 <sup>а, ж</sup>	24 ± 4 <sup>б, и</sup>	24 ± 1 <sup>в, к</sup>	47 ± 8 <sup>г, ж, и, к</sup>
Опухоль	3,86 ± 0,7 <sup>г</sup>	4,51 ± 0,6 <sup>ж</sup>	3,27 ± 0,4 <sup>з, и</sup>	5,6 ± 1 <sup>з, к</sup>	8,8 ± 1,2 <sup>г, ж, и, к</sup>
Мышцы	0,14 ± 0,02 <sup>а, в, г</sup>	0,40 ± 0,07 <sup>а, д</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>д, з, и</sup>	0,43 ± 0,08 <sup>в, к</sup>	0,36 ± 0,05 <sup>г, и</sup>
Кость	0,24 ± 0,04 <sup>а, б, в, г</sup>	0,66 ± 0,02 <sup>а, д</sup>	0,46 ± 0,06 <sup>б, д, з, и</sup>	0,79 ± 0,04 <sup>в, з, к</sup>	0,70 ± 0,08 <sup>г, и</sup>
ЖКТ*	0,66 ± 0,05	1,56 ± 0,2	1,7 ± 0,3	2,57 ± 0,4	1,21 ± 0,2
Тело*	3,8 ± 0,3	11,6 ± 1	6,2 ± 0,5	12,6 ± 0,8	8,6 ± 0,9

Примечание: <sup>а</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN288** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN576** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>б</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN288** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS300** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>в</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN288** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS600** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

## Продолжение Таблицы Б.3

<sup>z</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN288** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD**-DM1 (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>d</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN576** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS300** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>e</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN576** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS600** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>жс</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**XTEN576** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD**-DM1 (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>з</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS300** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS600** (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>и</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS300** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD**-DM1 (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

<sup>к</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-DM1-**PAS600** и [<sup>99m</sup>Tc]Tc-Z<sub>HER2</sub>-G<sub>4</sub>S-**ABD**-DM1 (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);

\* – Данные представлены в виде % ВД на весь образец.

Таблица Б.4 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами в мышах линии BALB/В nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3, через 4, 24 и 48 ч после инъекции

Орган	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAE}}$			$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAF}}$			$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-DM1}}$		
	4 ч	24 ч	48 ч	4 ч	24 ч	48 ч	4 ч	24 ч	48 ч
Кровь	$16 \pm 2^{a, \bar{b}}$	$7 \pm 1^{\bar{b}}$	$4,5 \pm 0,2^{a, \bar{b}}$	$13 \pm 1^{ae}$	$7 \pm 1^e$	$3,9 \pm 0,2^{a, e}$	$11,8 \pm 0,2^{\bar{b}, e}$	$4,9 \pm 0,4^{\bar{b}, e}$	$2,9 \pm 0,3^{\bar{b}, e}$
Слюнные железы	$3 \pm 1^{a, \bar{b}}$	$2,3 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1^{\bar{b}}$	$2,2 \pm 0,1^a$	$2,2 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,1^{\bar{b}}$	$2,0 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,1^{\bar{b}}$
Легкие	$6,5 \pm 0,3^{a, \bar{b}}$	$3,6 \pm 0,4^{\bar{b}}$	$2,6 \pm 0,2^{\bar{b}}$	$5,3 \pm 0,3^{a, e}$	$3,5 \pm 0,4^e$	$2,5 \pm 0,1^e$	$4,5 \pm 0,2^{\bar{b}, e}$	$2,6 \pm 0,3^{\bar{b}, e}$	$1,8 \pm 0,2^{\bar{b}, e}$
Печень	$9 \pm 1^a$	$5,5 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,4$	$7 \pm 1^{a, e}$	$5,2 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,1$	$9 \pm 1^e$	$5,8 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,3$
Селезенка	$6 \pm 1^a$	$3,9 \pm 0,4$	$3 \pm 1$	$4,1 \pm 0,3^{a, e}$	$4 \pm 1$	$3,6 \pm 0,3^e$	$5 \pm 1^e$	$4 \pm 1$	$2,9 \pm 0,4^e$
Тонкий кишечник	$3 \pm 1$	$1,6 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	$3 \pm 1$	$1,7 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,4$	$2 \pm 1$	$1,4 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
Желудок	$2,4 \pm 0,4^{\bar{b}}$	$1,2 \pm 0,1$	$0,86 \pm 0,03^{\bar{b}}$	$1,9 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1^{\bar{b}}$	$1,0 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1^{\bar{b}}$
Толстый кишечник	$2,2 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,1^{\bar{b}}$	$0,99 \pm 0,02^{\bar{b}}$	$2 \pm 1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1^{\bar{b}}$	$0,8 \pm 0,1^{\bar{b}}$
Почки	$80 \pm 8$	$43 \pm 5^{a, \bar{b}}$	$26 \pm 3$	$83 \pm 5$	$53 \pm 3^a$	$32 \pm 3$	$86 \pm 5$	$53 \pm 5^{\bar{b}}$	$29 \pm 5$
Опухоль	$6 \pm 1^{a, \bar{b}}$	$11 \pm 4$	$9 \pm 3$	$4 \pm 1^a$	$7 \pm 2$	$9 \pm 2$	$4 \pm 1$	$6 \pm 1$	$7 \pm 2$
Мышцы	$1,0 \pm 0,1^a$	$1,0 \pm 0,2^{\bar{b}}$	$0,7 \pm 0,1^{\bar{b}}$	$0,8 \pm 0,1^a$	$0,80 \pm 0,04^e$	$0,6 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1^{\bar{b}, e}$	$0,5 \pm 0,1^{\bar{b}}$
Кости	$2,0 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1^a$	$1,8 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1^{ae}$	$1,9 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1^e$
Остаток ЖКТ*	$5 \pm 1^{\bar{b}}$	$2,2 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,3^{\bar{b}}$	$4 \pm 1$	$2 \pm 1$	$1,5 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3^{\bar{b}}$	$1,9 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2^{\bar{b}}$
Тело*	$30 \pm 2^{a, \bar{b}}$	$22 \pm 1^{\bar{b}}$	$17 \pm 1^{\bar{b}}$	$26 \pm 1^{a, e}$	$23 \pm 2^e$	$17 \pm 1^e$	$24 \pm 1^{\bar{b}, e}$	$18 \pm 1^{\bar{b}, e}$	$13 \pm 1^{\bar{b}, e}$

Примечание: <sup>a</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAE}}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAF}}$  (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);  
<sup>b</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAE}}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-DM1}}$  (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);  
<sup>e</sup> – значимое различие ( $p < 0,05$ ) между  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAF}}$  и  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-DM1}}$  (4, 24, 48 ч в сравнении с 4, 24, 48 ч, соответственно);  
\* – данные представлены в виде % ВД на весь образец.





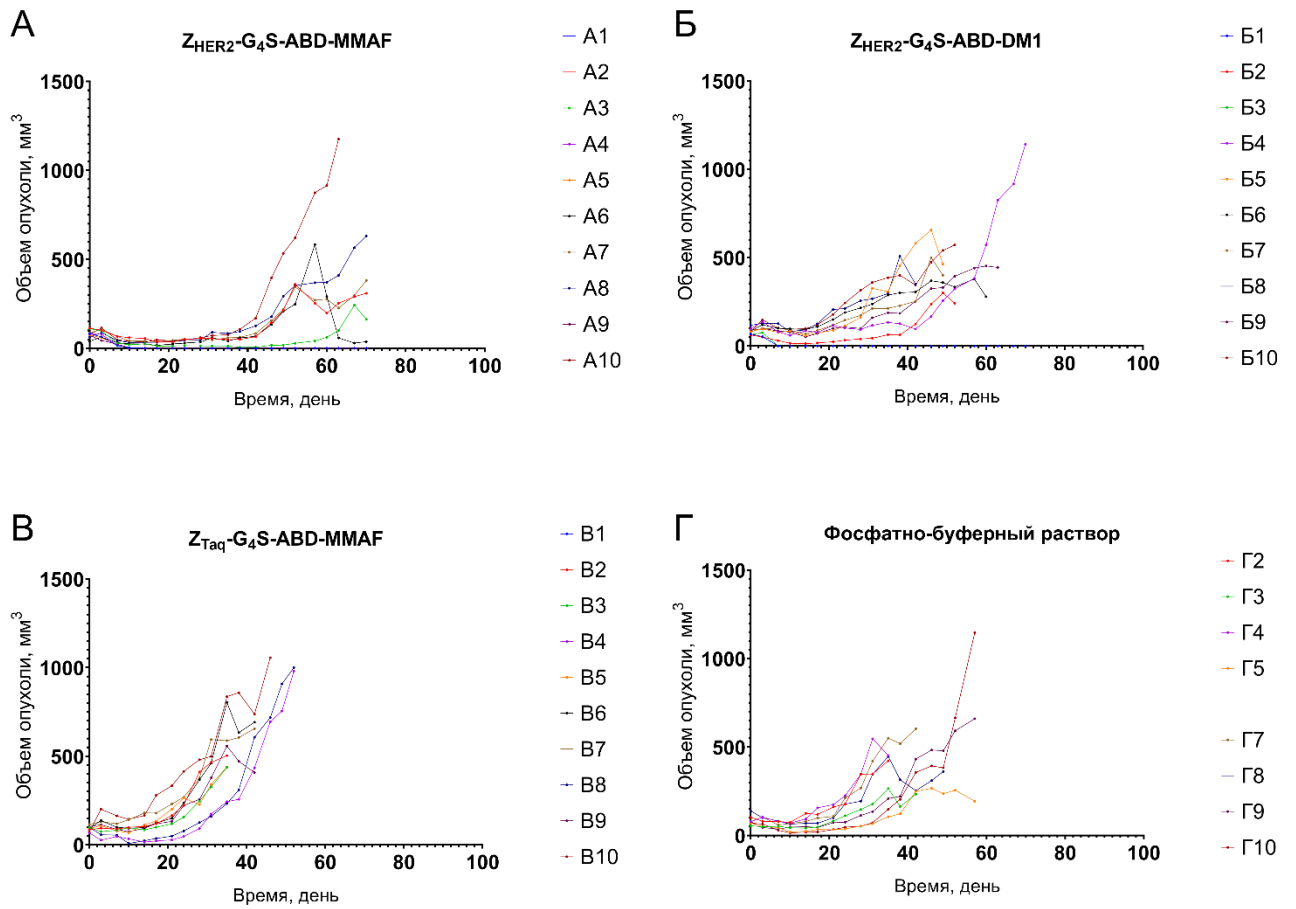


Рисунок В.1 – Индивидуальные кривые роста опухолей во время экспериментальной терапии у мышей BALB/c nu/nu с ксенотрансплантатами SKOV3, получавших инъекции (А)  $Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}MMAF$ , (Б)  $Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}DM1$ , (В)  $Z_{Taq}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}MMAF$  (нетаргетный контроль) или (Г) фосфатно-буферный раствор (контрольная группа растворителя) в дозе 2,9 мг/кг один раз в неделю.

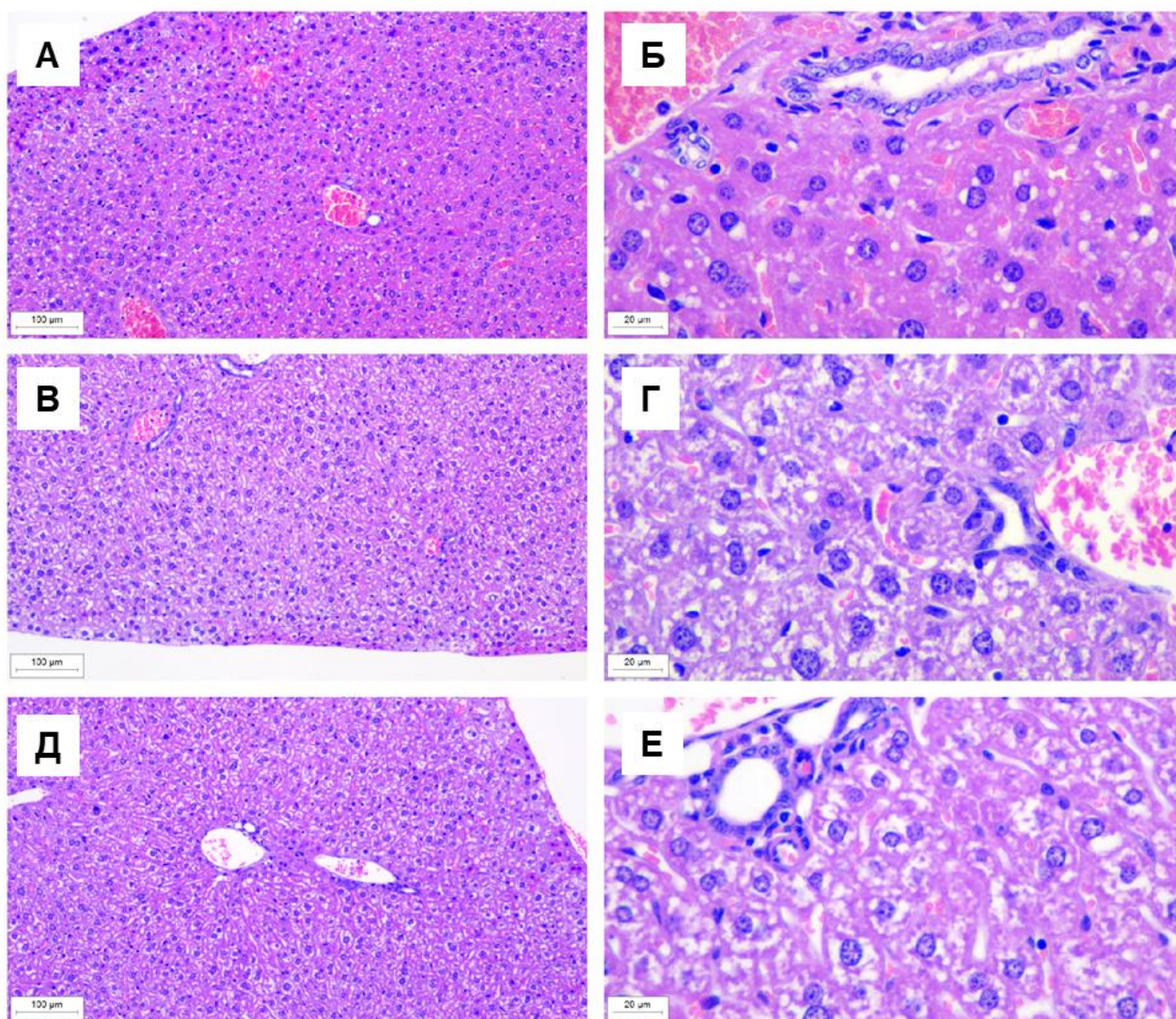


Рисунок В.3 – Гистологическое исследование печени мышей после экспериментальной терапии для групп  $Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}MMAF$  (А, Б),  $Z_{HER2}\text{-}G_4S\text{-}ABD\text{-}DM1$  (В, Г) и группы PBS (Д, Е). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100х и 400х

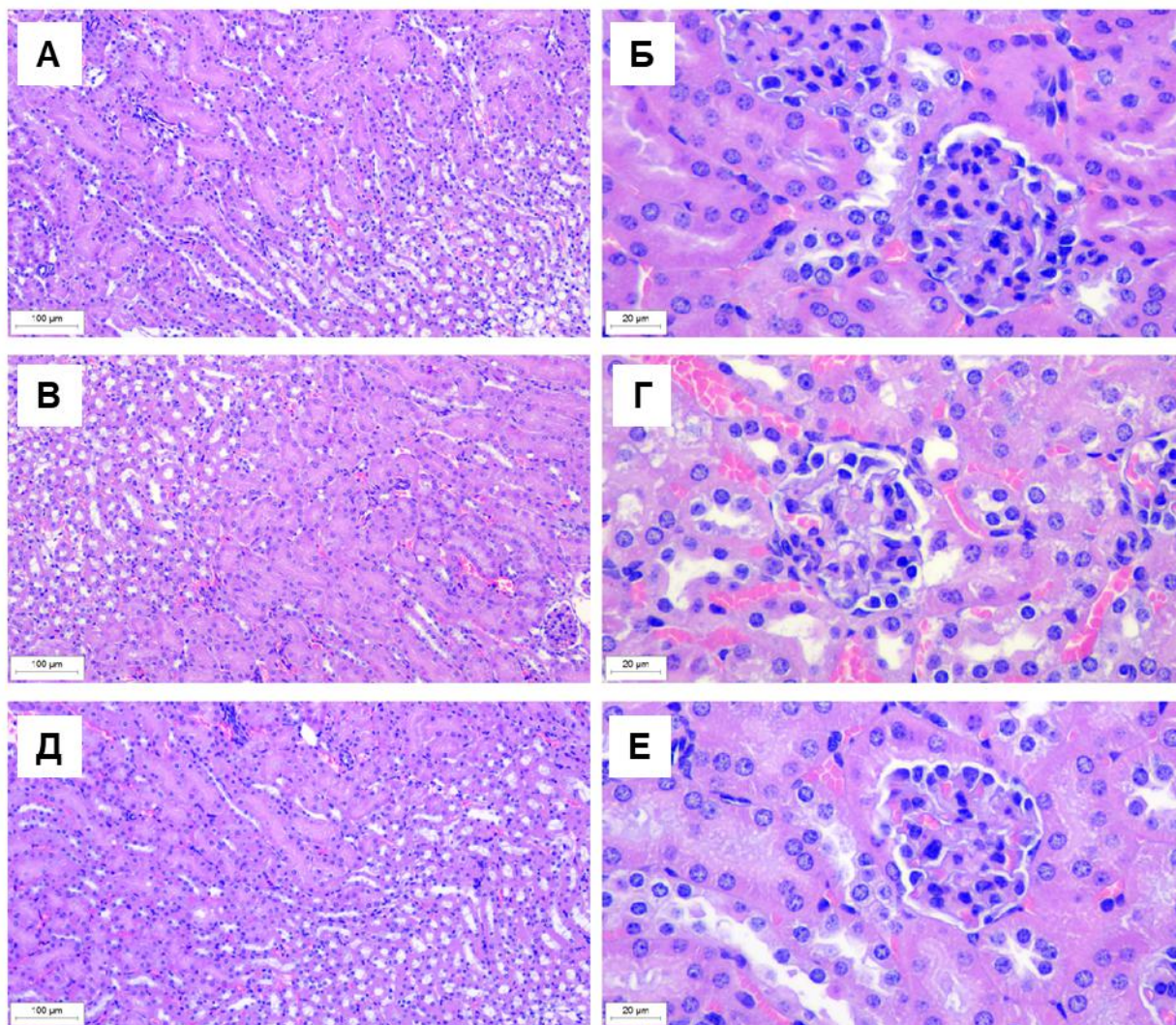


Рисунок В.4 – Гистологическое исследование почек мышей после экспериментальной терапии для групп  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$  (А, Б),  $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$  (В, Г) и группы PBS (Д, Е). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100х и 400х