

БОДЕНКО ВИТАЛИНА ВАСИЛЬЕВНА

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

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук,
профессор

Белоусов Михаил Валерьевич

доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент РАН

Чернов Владимир Иванович

Официальные оппоненты:

Толстикова Татьяна Генриховна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория фармакологических исследований, заведующая лабораторией

Новиков Сергей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научное отделение радиационной онкологии и ядерной медицины, заведующий научным отделением

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2026 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», по адресу: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта: <http://tnimc.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Минакова Мария Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (W.H. Organization, 2022). 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) (Cheng X. et al., 2024; Tai W. et al., 2010). HER2 представляет собой трансмембранный белок с тирозинкиназной активностью, играющий решающую роль в пролиферации, выживании и дифференцировке здоровых клеток (Cheng X. et al., 2024). Амплификация и (или) гиперэкспрессия HER2 обнаруживается в 20–30 % случаев рака молочной железы (Ahuja S. Et al., 2024), 6–30 % случаев рака желудка и гастроэзофагеальных аденокарцином (Baretton G. et al., 2019), 2–66 % случаев рака яичников (Luo H. et al., 2018), 60 % случаев рака эндометрия (Hacker K. E. et al., 2025), 6–17 % случаев рака мочевого пузыря (Ding W. et al., 2015), 2–6 % случаев рака легких (Bhagyalalitha M. et al., 2024), 3–5% случаев рака толстой кишки (Ross J. S. et al., 2018). Гиперэкспрессия или амплификация HER2 коррелирует с агрессивным поведением опухоли и плохим прогнозом (Iqbal N. et al., 2014). Мутации, приводящие к активации HER2, способствуют ускоренному опухолеобразованию и метастазированию (Bose R. et al., 2013). 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 (Khoury R. et al., 2023). Высокая распространенность HER2-позитивных 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 (Gebauer M. et al., 2009). В качестве носителя цитотоксической нагрузки в таргетных терапевтических конъюгатах перспективной альтернативой моноклональным антителам являются высокоаффинные каркасные белки аффибоди (Affibody Medical AB) (Feldwisch J. et al., 2012; Martín M. Et al., 2024).

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 (Feldwisch J. et al., 2012). 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 (Eissler N. et al., 2024).

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 ауристатинны, дестабилизирующие полимеризацию тубулина. Производное майтанзина – эмтанзин (DM1) на данный момент применяется в составе конъюгата с мкАТ для HER2-направленной терапии (трастузумаб эмтанзин) (Barok M. et al., 2014; Hurvitz S. A. et al., 2018; Verma S. Et al., 2012; Krop I. E. et al., 2017; Perez E. A. et al., 2017). Аналогично, имеется опыт клинического применения производных ауристатина, таких как монометил ауристатин Е (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) (Theocharopoulos C. et al., 2021).

Исследования показали, что для достижения оптимальных фармакокинетических свойств препарата на основе аффибоды, главным образом, для снижения почечной экскреции, необходимо контролируемое увеличение времени его нахождения в плазме крови (Feldwisch J. et al., 2012). Для реализации этой цели в составе конъюгатов на основе аффибоды в доклинических исследованиях успешно применялся альбумин-связывающий домен ABD₀₃₅ (Dennis M. S. et al., 2002; Jonsson A. et al., 2008). Перспективными подходами также является применение неструктурированных биоразлагаемых полипептидов PAS и XTEN (Kontermann R. E., 2016). Альбумин-связывающий домен ABD₀₃₅ 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 (Binder U., 2025).

Таким образом, конъюгаты, состоящие из высокоаффинного каркасного белка аффибоды 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. В качестве нацеливающей молекулы аффибоды успешно продемонстрировали себя в доклинических и в клинических исследованиях I и II фазы, преимущественно как носители радионуклидов для диагностического применения, в частности аффибоды [⁶⁸Ga]Ga-ABY-025 (тезатабеп матракетан) (Alhuseinalkhudhur A. et al., 2023; Altena R. et al., 2024; Sandberg D. et al., 2017; Sandström M. et al., 2016; Sörensen J. et al., 2016), [¹⁸F]F-GE-226 (Kenny L. M. et al., 2024) для ПЭТ и [¹¹¹In]In-ABY-002 (Baum R. P. et al., 2010), [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2:41071} (Bragina O. et al., 2023) для ОФЭКТ визуализации HER2-положительного метастатического РМЖ, а также ⁶⁸Ga-NOTA-MAL-MZHER2 для ПЭТ визуализации HER2-положительных карциномы желудка или гастроэзофагеальной карциномы (Eissler N. et al., 2024; Zhou N. et al., 2021). В качестве носителя низкомолекулярной цитотоксической нагрузки в составе конъюгатов для терапевтического применения молекулы аффибоды описаны исследования в доклинических моделях. Конъюгат молекулы аффибоды Z_{HER2:2891}, слитой с альбумин-связывающим доменом (ABD₀₃₅), и цитотоксина DM1 продемонстрировал специфическое цитотоксическое воздействие *in vitro* и эффективную регрессию HER2-экспрессирующих опухолей *in vivo* (Xu T. et al., 2021).

Цель работы: исследование и разработка нового HER2-направленного терапевтического конъюгата на основе высокоаффинного каркасного белка аффибоды и цитотоксического агента.

Задачи исследования:

1. Нарботать линейку и оценить качество HER2-направленных терапевтических конъюгатов на основе высокоаффинного каркасного белка аффибоды 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 HER2-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_{HER2:2891}, слитого с ABD, PAS или XTEN, и цитотоксических агентов DM1, MMAE или MMAF с включением междоменных глицин-сериновых линкеров G₄S, (G₃S)₃, (S₃G)₃.

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 (G₃S)₃ и (S₃G)₃ значительно снижают накопление разработанных конъюгатов в печени, по сравнению с коротким линкером G₄S. Впервые применены стратегии увеличения периода полувыведения для молекул аффибоди с использованием неструктурированных полипептидов XTEN и PAS.

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

Впервые определен терапевтический эффект *in vivo* с введением конъюгатов Z_{HER2}-G₄S-ABD-MMAF и Z_{HER2}-G₄S-ABD-DM1 в дозе 2,9 мг/г 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 проведены следующие методы исследования: определение специфичности связывания, аффинности

связывания и интернализации *in vitro* на клеточных культурах опухолей человека; определение биораспределения *in vivo* на здоровых мышцах стока CD1 и линии NMRI; определение таргетной специфичности *in vivo* на иммунодефицитных мышцах линии BALB/c nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты опухоли; проведение экспериментальной терапии *in vivo* на иммунодефицитных мышцах линии BALB/c nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты опухоли. Объектами исследования являлись конъюгаты аффибоды Z_{HER2:2891}, слитого с ABD, PAS или XTEN, и цитотоксических агентов DM1, MMAE или MMAF с включением междоменных линкеров G₄S, (G₃S)₃, (S₃G)₃.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны HER2-направленные терапевтические конъюгаты на основе аффибоды Z_{HER2:2891}, слитого с ABD, PAS или XTEN, и цитотоксических агентов DM1, MMAE или MMAF с включением междоменных линкеров G₄S, (G₃S)₃, (S₃G)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 G₄S 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}-G₄S-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}-G₄S-ABD-MMAF имеет большую эффективность, по сравнению с конъюгатом Z_{HER2}-G₄S-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 г.), 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В первой главе диссертации проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования. Представлены сведения об онкогенной роли рецептора HER2 и современных таргетных препаратах для HER2-направленной терапии. Описаны структура таргетных терапевтических конъюгатов и влияние структурных компонентов терапевтического конъюгата на его фармакологические свойства. Рассмотрены альтернативные каркасные белки аффибоди в качестве нацеливающей молекулы и способы оптимизации таргетных конъюгатов на основе аффибоди.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. Исследования проводились на базе лаборатории иммунологии, генетики и патологии университета Уппсалы (Швеция) под руководством профессора Толмачева В.М., на базе лабораторий научно-исследовательского центра «Онкотераностика» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет». Для проведения экспериментов *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), приобретённые из Американской коллекции типовых культур (ATCC, LGC Promochem, Борос, Швеция). Эксперименты *in vivo* были выполнены на 60 аутбредных мышах-самках стока CD1, 36 аутбредных мышах-самках линии NMRI, 112 мышах-самках линии BALB/c nu/nu. 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).

Объектами исследования являлись HER2-направленные таргетные терапевтические конъюгаты на основе высокоафинного каркасного белка аффибоди, конъюгированного с цитотоксическими агентами. Структура конъюгатов: HER2-направленная молекула аффибоди Z_{HER2:2891} (далее именуемая Z_{HER2}), слитая с полипептидным фрагментом для увеличения периода полувыведения (ABD₀₃₅, XTEN288, XTEN576, PAS300, PAS600), домены слитых белков соединялись глицин-сериновыми линкерами Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G₄S), (Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (G₃S)₃, (Ser-Ser-Ser-Gly)₃ (S₃G)₃. 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 (E₃C) 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 1.

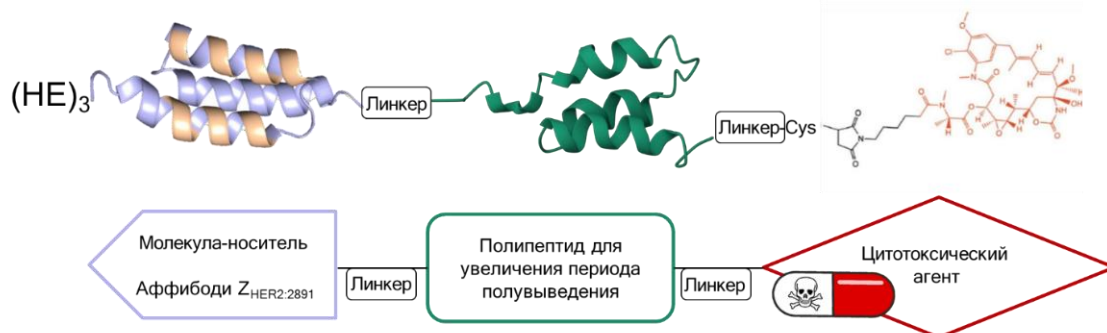


Рисунок 1 – Схематическое изображение общей структуры исследуемых конъюгатов

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_{HER2}-G₄S-ABD-DM1.

1. Группа конъюгатов с различным составом междоменных линкеров, ((G₄S), (G₃S)₃, (S₃G)₃): Z_{HER2}-(G₃S)₃-ABD-DM1, Z_{HER2}-(S₃G)₃-ABD-DM1 в сравнении с Z_{HER2}-G₄S-ABD-DM1. Контрольная конструкция, не содержащая цитотоксического агента, Z_{HER2}-(G₃S)₃-ABD-AA, создана для оценки нецелевых цитотоксических свойств *in vitro*.

2. Группа конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения (ABD₀₃₅, XTEN288, XTEN576, PAS300, PAS600): Z_{HER2}-DM1-XTEN288, Z_{HER2}-DM1-XTEN576, Z_{HER2}-DM1-PAS300, Z_{HER2}-DM1-PAS600 в сравнении с Z_{HER2}-G₄S-ABD-DM1.

3. Группа конъюгатов с разными цитотоксическими агентами (DM1, MMAE, MMAF): Z_{HER2}-G₄S-ABD-MMAE, Z_{HER2}-G₄S-ABD-MMAF в сравнении с Z_{HER2}-G₄S-ABD-DM1. Контрольная конструкция с нецелевой молекулой аффибоди, Z_{Tag}-G₄S-ABD-MMAF, создана для оценки нецелевых цитотоксических свойств *in vitro* и *in vivo*.

Экспрессия и очистка слитых белков аффибоди. Слитые белки аффибоди были экспрессированы в культурах *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) (New England Biolabs) и очищены с помощью анионообменной хроматографии (8 мл, Q-Sepharose FF; GE healthcare, Uppsala, Sweden) с последующей обращенно-фазовой хроматографией (3 мл, Source RPC, GE Healthcare) с использованием ÄKTA-system (GE Healthcare).

Конъюгация слитых белков аффибоди с цитотоксическим агентом. Для восстановления окисленных C-концевых цистеинов слитые белки инкубировали (1 ч, 37 °C) с 5 мМ трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлоридом (TCEP) и пропускали через эксклюзионные картриджи PD-10 (GE Healthcare). Каждый препарат цитотоксического агента с малеимидапроиловым (mc) линкером, mcDM1, mcMMAF, mcMMAE (20 мМ, Levena Biopharma, Сан-Диего, Калифорния, США) в виде свежеприготовленного раствора добавлялся в молярном соотношении 3:1 или 2:1 (препарат цитотоксического агента: белок) к раствору, содержащему слитый белок аффибоди, с последующей инкубацией (комнатная температура, 1 ч). Нетоксичные контрольные конструкции были получены путем алкилирования C-концевых цистеинов Z_{HER2}-(G₃S)₃-ABD-E₃-Cys и Z_{HER2}-(S₃G)₃-ABD-E₃-Cys с помощью 10 мМ 2-йодацетамида (IAA). Полученные конъюгаты 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).

Методы оценки качества таргетных терапевтических конъюгатов на основе аффибоди. Полученные конъюгаты анализировали с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях на геле NuPAGE Bis-Tris (12 %, Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Конъюгаты также подвергали аналитической эксклюзионной хроматографии с использованием колонки Superdex-75 5/150 (GE Healthcare) и фосфатно-буферным раствором (PBS) в качестве рабочего буфера, скорость потока составляла 0,45 мл/мин. Очищенные конъюгаты анализировали с помощью масс-спектрометрии ESI-TOF (Agilent) и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ, Zorbax C18 SB, Agilent) с использованием 30-минутного градиента от 30 % до 60 % буфера В (0,1 % трифторуксусная кислота в ацетонитриле) при скорости потока 1 мл/мин. Чистоту определяли путем расчета площади под кривой из всех пиков в записанных хроматограммах.

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 $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ через аминокислотную последовательность (HE)₃ (His-Glu-His-Glu-His-Glu) на N-конце конъюгатов. Для приготовления раствора $[[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ в коммерческий набор «CRS Isolink kit» (Center for Radiopharmaceutical Science, Виллиген, Швейцария) добавляли раствор $[[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ (500 мкл, 3,2–4,7 ГБк), полученный из генератора $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Mallinckrodt, Petten, Нидерланды), инкубировали (100 °С, 30 минут) и нейтрализовали 0,1 М HCl в соотношении 1:1. Далее 19–26 мкл (80 МБк) нейтрализованного раствора прекурсора смешивали с 23–113 мкл (30–60 мкг) исследуемого конъюгата и инкубировали (60 °С, 60 мин). Радиохимический выход и радиохимическая чистота меченных соединений методом тонкослойной радиохроматографии (радио-ТСХ) с использованием полосок силикагеля для ТСХ (Varian, Лейк-Форест, Калифорния, США) в качестве неподвижной фазы и PBS в качестве подвижной фазы. 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.

Оценка цитотоксичности и определение IC₅₀ методом WST-8-теста. Серийные разведения концентраций немеченных конъюгатов добавляли к клеткам с высокой экспрессией HER2 (SKOV3, SKBR3, AU565 и BT474) и с низкой экспрессией HER2 (A549 и MCF7) с последующей инкубацией в течение 72 ч при 37 °С, 5 % CO₂. В качестве контроля использовали культуры клеток без добавления исследуемых конъюгатов. Жизнеспособность клеток определяли с использованием реактива WST-8 (Water-Soluble Tetrazolium 8) в составе коммерческого набора ССК-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США, 10 мкл на лунку, 3 ч при 37 °С, 5 % CO₂). 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 численного выражения цитотоксичности конъюгатов определяли концентрацию полумаксимального ингибирования (IC₅₀) – 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 IC₅₀ методом нелинейной регрессии проводили с использованием программы Prism (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

Оценка специфичности связывания. Для насыщения рецепторов HER2 в один набор чашек каждой клеточной линии (SKOV3, BT474 и SKBR3) добавляли немеченные конъюгаты (1000 нМ), в другой набор чашек добавляли равный объем культуральной среды, чашки инкубировали (37 °С, 30 мин). Далее в чашки добавляли ^{99m}Tc -меченные конъюгаты (2 нМ) и инкубировали (37 °С, 60 мин). Собирали надклеточную среду и клеточный лизат, полученный после инкубации с 1 М NaOH. Активность фракций измеряли с помощью автоматического

гамма-спектрометра с NaI (TI) детектором (2480 Wizard, Финляндия) и рассчитывали процент клеточно-ассоциированной активности.

Измерение аффинности связывания проводилось с использованием прибора LigandTracer Yellow (Ridgeview Instruments, Vänge, Швеция) на клетках SKOV3. В каждую чашку добавляли возрастающие концентрации (1, 2 и 5 нМ) соответствующего ^{99m}Tc -меченного конъюгата с последующим измерением клеточно-ассоциированной активности и активности контрольной области чашки. После добавления последней концентрации и установления равновесия «лиганд-рецептор» среду заменяли на среду без конъюгата и регистрировали фазу диссоциации в течение ночи. В полученные данные вносили поправку на распад ^{99m}Tc . Анализ данных и определение равновесных констант диссоциации (значений K_d) производили с помощью программы TraceDrawer (Ridgeview Instruments).

Оценка интернализации. В чашки с клетками SKOV3 и BT474 добавляли ^{99m}Tc -меченные исследуемые конъюгаты (2 нМ) с последующей инкубацией при 37 °С, 5 % CO_2 в течение 1, 2, 4, 6 и 24 ч. Далее собирали надклеточную среду. Для сбора мембранно-связанной фракции клетки инкубировали с 0,2 М глициновым буфером, содержащим 4 М мочевины (рН 2,0), в течение 5 минут на льду. Для сбора интернализованной фракции собирали клеточный лизат, полученный после инкубации с 1 М NaOH. Активность фракций измеряли с использованием автоматического гамма-спектрометра с NaI (TI) детектором (2480 Wizard, Финляндия) и рассчитывали процент клеточно-ассоциированной активности для каждой фракции.

Изучение функциональной пригодности, биораспределения и фармакокинетики таргетных терапевтических конъюгатов *in vivo*. Изучение биораспределения *in vivo* для группы конъюгатов с различным составом межмономерных линкеров проводилось на 36 здоровых мышах-самках линии NMRI. Каждый ^{99m}Tc -меченный конъюгат группы внутривенно вводили в хвостовую вену в дозе 6 мкг (400 пмоль) вещества на мышь. **Изучение биораспределения *in vivo* для группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения,** проводилось на 60 здоровых мышах-самках стока CD-1. Каждый ^{99m}Tc -меченный 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). **Для изучения на моделях опухолевого роста группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения,** HER2-позитивная клеточная линия SKOV3 (1×10^7 клеток в 100 мкл среды) и HER2-негативная клеточная линия Ramos (человеческая клеточная линия лимфомы Биркитта, 5×10^6 клеток в 100 мкл среды) были подкожно введены в заднюю ногу самок мышей линии BALB/c nu/nu. Исследования проводились через две недели после имплантации опухоли. Каждый исследуемый конъюгат внутривенно вводили в хвостовую вену в дозе 200 пмоль вещества на мышь в объеме 100 мкл PBS, содержащего 1% БСА. **Для изучения на моделях опухолевого роста группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами** 10^7 HER2-экспрессирующих клеток SKOV3 в объеме 100 мкл среды были подкожно введены в заднюю ногу 36 самкам мышей линии BALB/c nu/nu. Каждый ^{99m}Tc -меченный конъюгат группы внутривенно вводили в хвостовую вену в дозе 6 мкг (400 пмоль) вещества на мышь. Оценка биораспределения для всех групп проводилась через 4, 24 и 48 ч после инъекции. Введенная активность для всех групп 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 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 (TI) детектором (2480 Wizard, Финляндия). Поглощение активности рассчитывали как процент введенной дозы на грамм образца (% ВД/г).

Для проведения экспериментальной терапии *in vivo* с целью оценки противоопухолевого эффекта группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами 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}-G₄S-ABD-MMAF (группа А), Z_{HER2}-G₄S-ABD-DM1 (группа Б) в дозе 2,9 мг/кг, в контрольных группах аналогичным образом вводили контрольные вещества Z_{Taq}-G₄S-ABD-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. Мышей подвергали эвтаназии в заранее определенной гуманной конечной точке, когда объем опухоли достигал 1 см³, 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 ч 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 AB (Соллентуна, Швеция).

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).

В третьей главе представлены результаты собственных исследований и их обсуждение.

Получение и оценка качества таргетных терапевтических конъюгатов. Анализ методом эксклюзионной хроматографии продемонстрировал четкое разделение всех исследуемых конъюгатов на отдельные пики, подтверждая их мономерное состояние и отсутствие деградированных форм. Согласно анализу аналитической ОФ-ВЭЖХ, чистота всех конъюгатов составила свыше 95 %. Анализ SDS-PAGE показал высокую чистоту всех конъюгатов и подтвердил теоретически рассчитанные молекулярные массы, за исключением конъюгатов, содержащих полипептиды PAS и XTEN, которые мигрировали через гель медленнее, чем ожидалось, исходя из их молекулярной массы. Гидрофильные, неструктурированные и высокогидратированные полимеры PAS и XTEN проявляют нетипичную подвижность при электрофорезе, так как могут образовывать агрегаты; ввиду низкой гидрофобности связывать меньше додецилсульфата натрия (SDS) и мигрировать медленнее, имитируя большую молекулярную массу; высокая гидратированность дополнительно увеличивает их эффективный размер в геле (Brandl F. et al., 2017, Dyson H. J. et al, 2005, Uversky V. N. et al., 2002). Масс-спектрометрический анализ подтвердил теоретически рассчитанные молекулярные массы и показал высокую чистоту всех конъюгатов.

Результаты получения радиокомплексов таргетных терапевтических конъюгатов. Радиохимические выходы конъюгатов составили 93–99 %. Радиохимическая чистота конъюгатов после очистки с помощью эксклюзионной хроматографии составила более 98 %. Оценка

стабильности с использованием 1000-кратного избытка гистидина в течение 4 ч инкубации выявила незначительное высвобождение активности (0–4 %).

Результаты оценки цитотоксичности и определение IC_{50} . Результаты оценки цитотоксичности и значения IC_{50} представлены в таблице 1. Выявлены цитотоксические свойства в отношении HER2-опухолевых клеток для всех конъюгатов в наномолярном диапазоне. Наиболее высокоактивные цитотоксические свойства проявил цитотоксический агент MMAF в составе конъюгата $Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$.

Таблица 1 - Результаты оценки цитотоксичности таргетных конъюгатов методом WST-8 теста

Группа	Конъюгат	IC_{50} (нМ)		
		SKOV3	SKBR3	AU565
Группа конъюгатов с различным составом междоменных линкеров	$Z_{HER2}\text{-(G}_3\text{S)}_3\text{-ABD-DM1}$	40 ± 7	$2,2 \pm 0,7$	$2,3 \pm 0,3$
	$Z_{HER2}\text{-(S}_3\text{G)}_3\text{-ABD-DM1}$	150 ± 10	$2,7 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,4$
	$Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$	180 ± 11	$0,97 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$
Группа конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения	$Z_{HER2}\text{-DM1-XTEN288}$	43 ± 4	$5,7 \pm 1$	$1,5 \pm 0,01$
	$Z_{HER2}\text{-DM1-XTEN576}$	26 ± 2	$8,3 \pm 1$	$2,8 \pm 0,2$
	$Z_{HER2}\text{-DM1-PAS300}$	30 ± 2	$9,6 \pm 2$	$2,6 \pm 0,1$
	$Z_{HER2}\text{-DM1-PAS600}$	41 ± 3	$4,1 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,03$
	$Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$	34 ± 2	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
Группа конъюгатов с разными цитотоксическими агентами	$Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$	412 ± 17	$1,4 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,02$
	$Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$	12 ± 1	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,01$
	$Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAE}$	-	$8,2 \pm 0,9$	24 ± 3
	$Z_{Taq}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$	190 ± 12	170 ± 10	180 ± 14

Результаты оценки специфичности связывания. 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 заблокированной группе по сравнению с неблокированной группой. Результаты указывают на HER2-опосредованное специфичное связывание всех исследуемых конъюгатов. Уровень связанной с клетками активности коррелировал с уровнем экспрессии HER2 в клеточных линиях.

Результаты оценки аффинности связывания. 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 субнаномолярном диапазоне и K_{d2} со сродством в низком наномолярном диапазоне (таблица 2).

Таблица 2 – Константы равновесной диссоциации (K_d) взаимодействий группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров, меченных ^{99m}Tc , и рецепторов HER2 в HER2-экспрессирующих клеточных линиях SKOV3, n=3

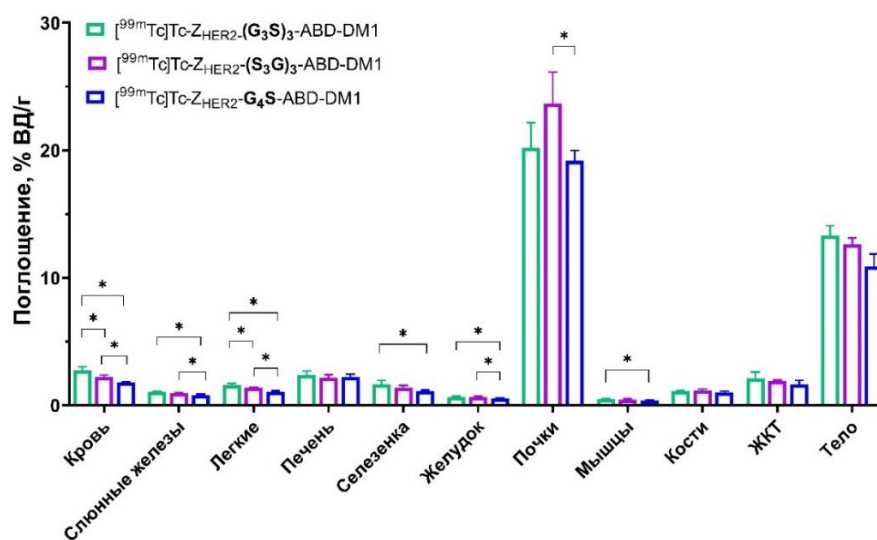
Группа	Конъюгат	K_{d1} , нМ	K_{d2} , нМ
Группа конъюгатов с различным составом междоменных линкеров	$Z_{HER2}\text{-(G}_3\text{S)}_3\text{-ABD-DM1}$	$1,3 \pm 0,4$	$22,5 \pm 0,7$
	$Z_{HER2}\text{-(S}_3\text{G)}_3\text{-ABD-DM1}$	$1,0 \pm 0,4$	$17,0 \pm 3,6$
	$Z_{HER2}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$	$0,56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

Продолжение Таблицы 2

Группа конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающими период полувыведения	Z _{HER2} -DM1-XTEN288	1,0 ± 0,2	18,9 ± 1,4
	Z _{HER2} -DM1-XTEN576	0,70 ± 0,05	20,1 ± 1,5
	Z _{HER2} -DM1-PAS300	0,37 ± 0,06	10,0 ± 1,6
	Z _{HER2} -DM1-PAS600	0,16 ± 0,1	7,0 ± 0,5
	Z _{HER2} -G ₄ S-ABD-DM1	0,46 ± 0,14	19,7 ± 2,7
Группа конъюгатов с разными цитотоксическими агентами	Z _{HER2} -G ₄ S-ABD-MMAE	0,44 ± 0,04	13,6 ± 0,6
	Z _{HER2} -G ₄ S-ABD-MMAF	0,42 ± 0,02	15,5 ± 5,8
	Z _{HER2} -G ₄ S-ABD-DM1	0,56 ± 0,20	18,4 ± 2,9

Результаты оценки интернализации. 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 интернализованная активность медленно, но непрерывно увеличивалась (до 22–42 % через 24 ч инкубации), и не наблюдалось выраженного снижения клеточно-ассоциированной активности во время инкубации. Изменение состава междоменных линкеров, цитотоксических агентов и полипептидных фрагментов, увеличивающих период полувыведения, не повлияло на характер связывания и интернализации конъюгатов.

Результаты оценки функциональной пригодности, биораспределения и фармакокинетики таргетных терапевтических конъюгатов *in vivo*. Изучение *in vivo* группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров в исследованиях на здоровых мышах линии NMRI. Для всех конъюгатов наблюдалось длительное удержание в крови и составило 10–13 % ВД/г через 4 ч после инъекции с постепенным снижением до 1,5–3 % ВД/г через 48 ч после инъекции (рисунок 2). Поглощение в нормальных органах и тканях соответствовало кинетике крови и снижалось с течением времени.



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

Рисунок 2 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров в мышах NMRI через 48 ч после инъекции (M ± SD)

Во всех трех временных точках наибольшее накопление активности наблюдалось в почках, снижающееся с течением времени, при этом через 48 ч после инъекции накопление было несколько, но значимо ниже ($p < 0,05$) для конъюгата с линкером G₄S (19 ± 1 % ВД/г) по сравнению с конъюгатом с линкером (S₃G)₃ (24 ± 2 % ВД/г). Накопление в печени было относительно низким (ниже 6 % ВД/г через 4 ч после инъекции). В совокупности данные демонстрируют выведение исследуемых конъюгатов преимущественно через мочевыделительную систему. Были определены небольшие, но значимые ($p < 0,05$) различия в здоровых органах: легких, селезенке. Для сравнительной оценки накопленной активности в печени была рассчитана площадь под кривой (AUC), представленная на рисунке 3. Значения AUC значимо ниже для конъюгатов с линкерами (G₃S)₃ (в 1,27 раза) и (S₃G)₃ (в 1,25 раза), по сравнению с конъюгатом с линкером G₄S. Использование линкеров из 12 аминокислот с высоким содержанием серина (S₃G)₃ и (G₃S)₃ привело к значимому снижению ($p < 0,05$) поглощения печенью по сравнению с использованием линкера G₄S.

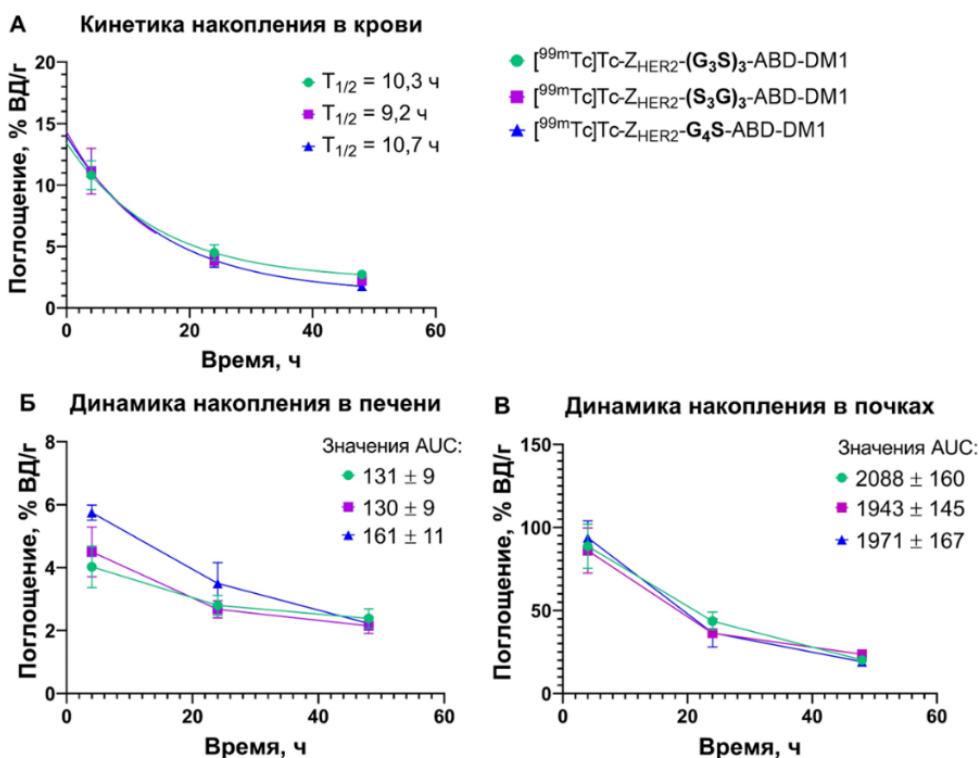
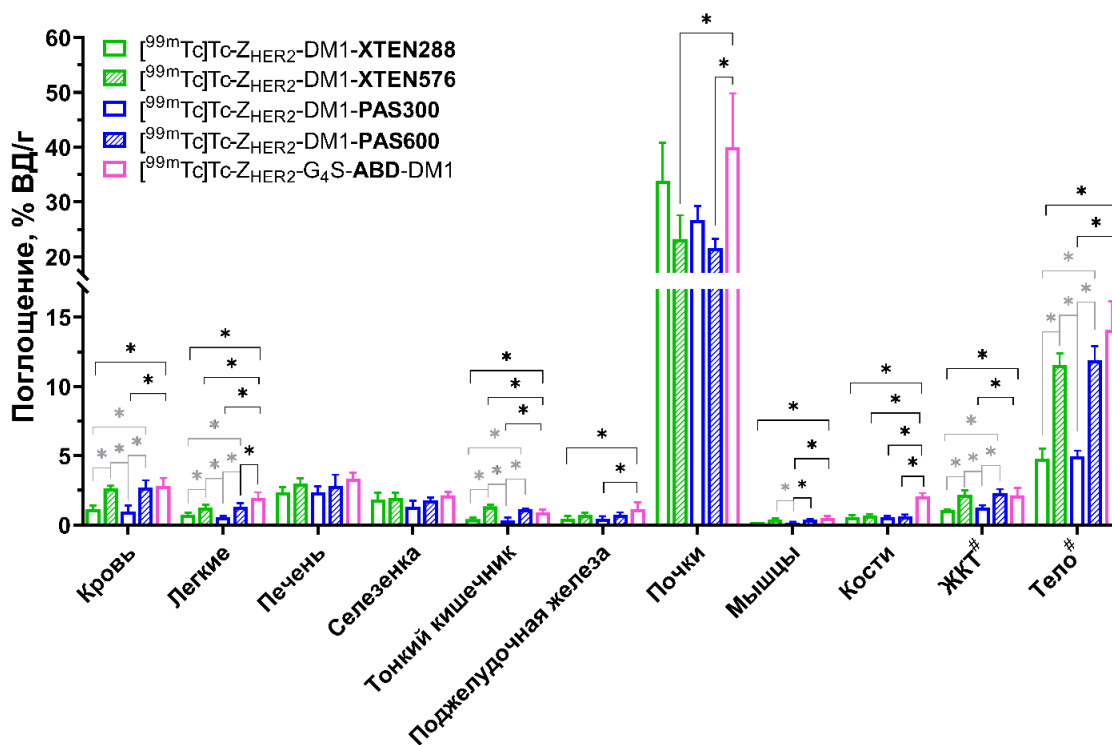


Рисунок 3 – Кинетика накопления активности в крови, представленная как функция от времени (А) и динамика поглощения активности в печени (Б) и почках (В), представленные как площадь под кривой «поглощение-время» (AUC) для группы конъюгатов с различным составом междоменных линкеров ($M \pm SD$)

Изучение *in vivo* группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами, увеличивающих период полувыведения. Результаты сравнительного биораспределения конъюгатов исследуемой группы в мышах CD-1 через 48 ч после инъекции представлены на рисунке 4. Определен схожий с группой конъюгатов с различным составом междоменных линкеров характер биораспределения. 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 (Ahlgren S. et al., 2010). Конъюгаты с полипептидами с меньшей длиной аминокислотной цепи и наименьшими молекулярными массами, [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-DM1-PAS300 и [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-DM1-XTEN288, имели наименьшие периоды полувыведения (7,3 и 7,6 ч, соответственно), за ними следовали [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-DM1-XTEN576 (8,7 ч) и [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-

G₄S-**ABD-DM1** (9,0 ч). Наиболее длинный период полувыведения (11,6 ч) наблюдался для [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-**DM1-PAS600**. Поглощение в нормальных органах и тканях соответствовало кинетике крови и снижалось с течением времени, за исключением стабильного поглощения в костях. 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}-G₄S-**ABD-DM1** (рисунок 5). Органом с наиболее высокими показателями поглощения активности были определены почки, что характерно для молекул аффибоди и также указывает на почечный клиренс всех исследуемых конъюгатов группы. Однако конъюгаты [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-**DM1-XTEN576** и [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-**DM1-PAS600** имели сниженное почечное поглощение по сравнению с конъюгатами [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-**DM1-XTEN288**, [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-**DM1-PAS300** и [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-**ABD-DM1**, что коррелирует с размером их молекул. Данные конъюгаты с двухкратно увеличенной молекулярной массой, с полипептидами XTEN576 и 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** (рисунок 5). Все конъюгаты группы показали специфичное накопление *in vivo* в HER2-экспрессирующих ксенографтах SKOV3 (рисунок 6).



* – 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 4 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения в мышах CD-1 через 48 ч после инъекции (M ± SD)

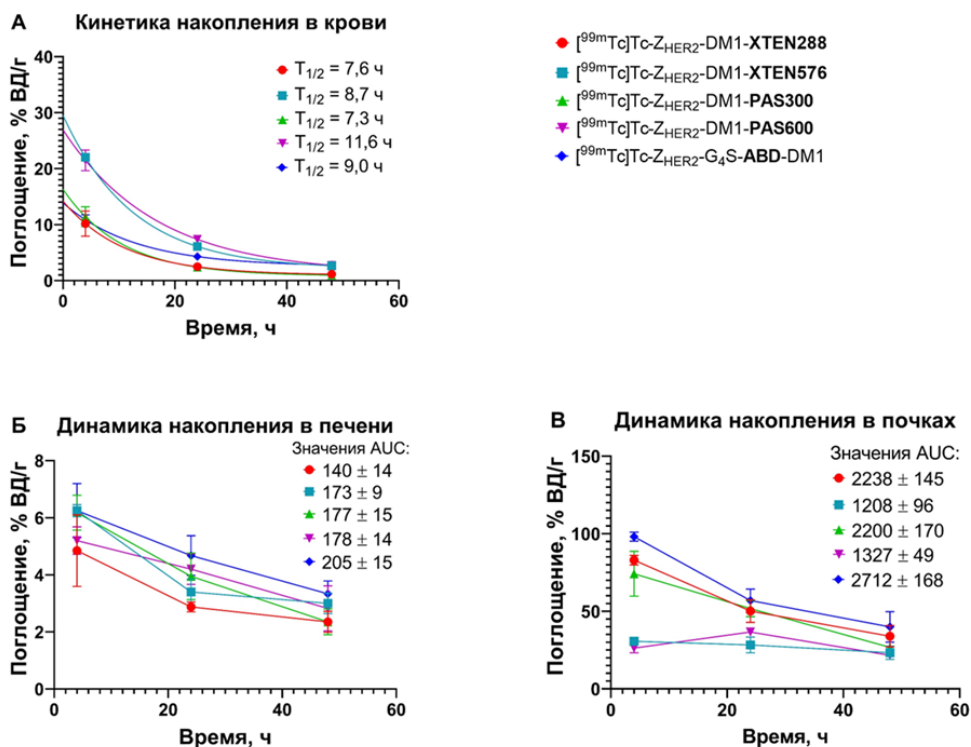
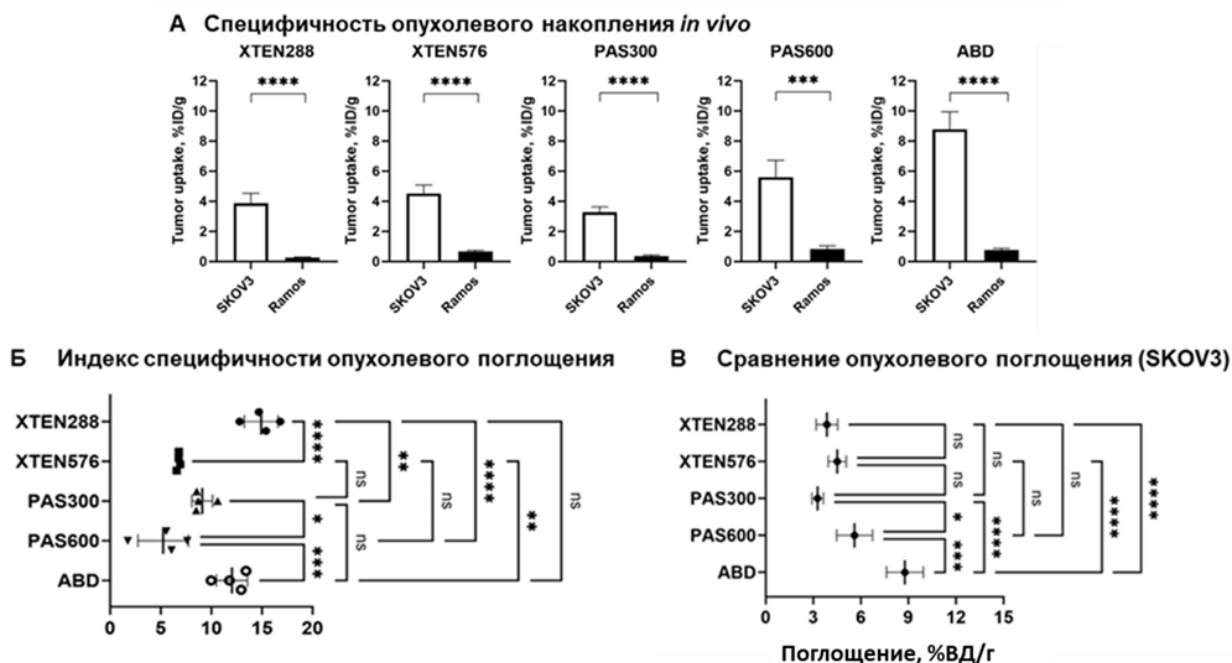


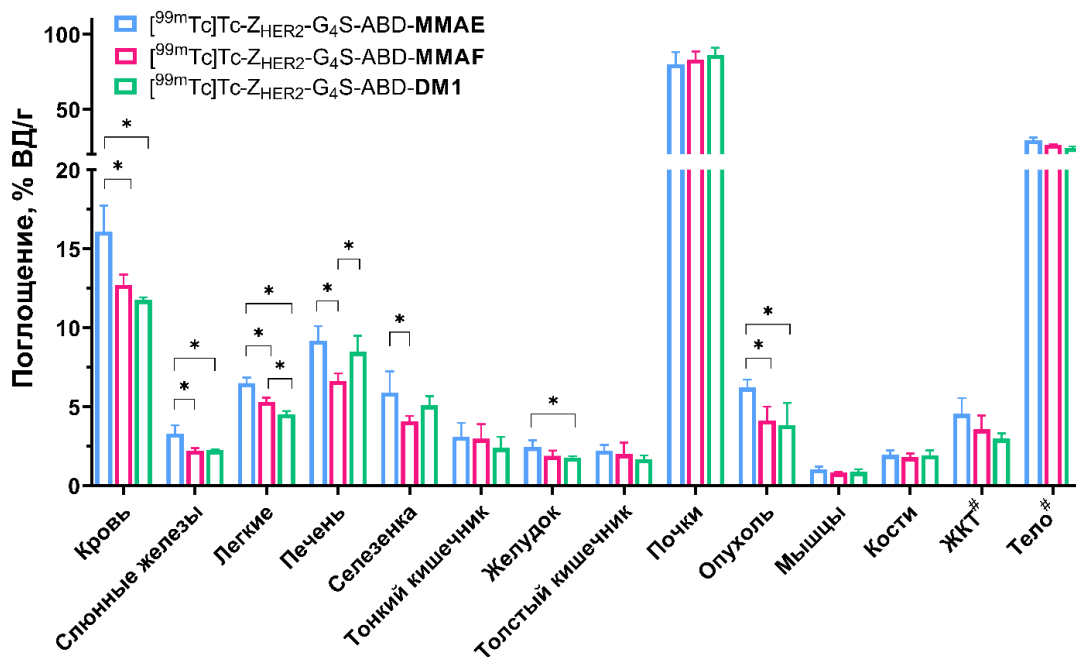
Рисунок 5 – Кинетика накопления активности в крови, представленная как функция от времени (А), и динамика накопления активности в печени (Б) и почках (В), представленные как площадь под кривой «поглощение-время» (AUC), в мышах CD1 для группы конъюгатов с разными полипептидными фрагментами для увеличения периода полувыведения ($M \pm SD$)



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

Изучение *in vivo* группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами. Для всех конъюгатов наблюдалось длительное удержание в крови с тенденцией к снижению в более поздние временные точки. Активность в большинстве нормальных органов снижалась с течением времени. Наиболее значимые различия в биораспределении среди группы наблюдались через 4 ч после инъекции (рисунок 7), по сравнению с более поздними временными точками. Через 4 ч 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. $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAE}}$ имел значимо ($p < 0,05$) более низкое поглощение в печени через 4 ч и общее более низкое накопление в печени, чем другие конъюгаты.

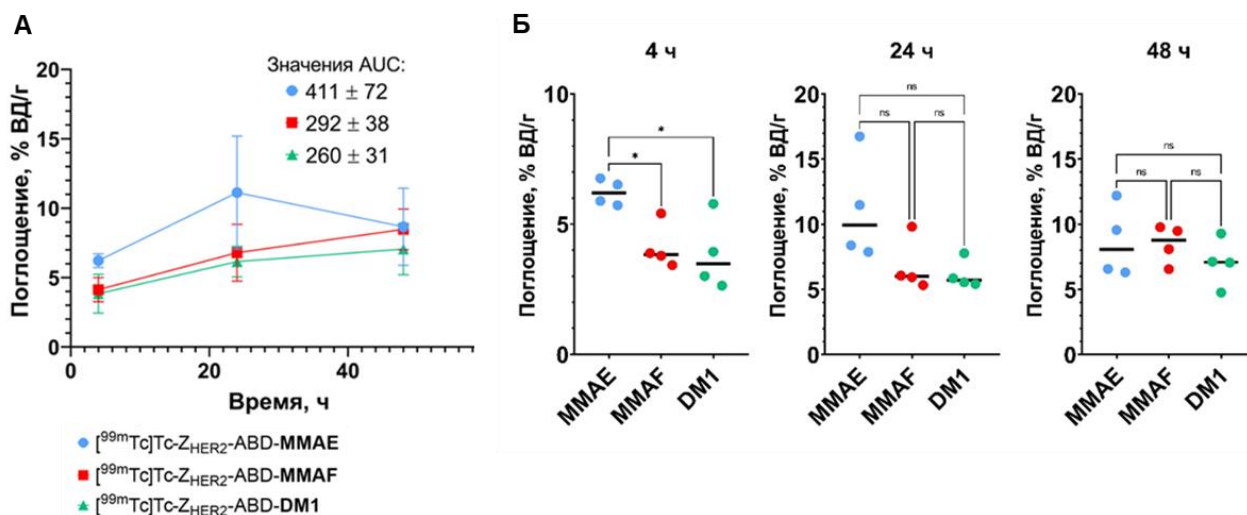


* – статистически значимые различия между группами при $p < 0,05$ (one-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки)

– данные представлены в виде % ВД на весь образец

Рисунок 7 – Сравнительное биораспределение группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами в мышцах линии BALB/c nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3, через 4 ч ($M \pm SD$)

Сравнение поглощения опухолью конъюгатов показало, что $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-MMAE}}$ и $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2-ABD-DM1}}$ имели схожее поглощение опухолью во всех временных точках (рисунок 8). 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 ч до 48 ч после инъекции. Через 4 ч после инъекции конъюгат с цитотоксином MMAE имел значимо более высокое ($p < 0,05$) поглощение опухолью (6 ± 1 % ВД/г) по сравнению с конъюгатами с цитотоксинами MMAF (4 ± 1 % ВД/г) и DM1 (4 ± 1 % ВД/г). В последующие временные точки значимых различий между накоплением в опухоли для конъюгатов не наблюдалось.



* – 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 8 – Динамика накопления поглощения опухолью, $M \pm SD$, (А) и сравнение опухолевого поглощения (Б) группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами в мышцах линии BALB/c nu/nu, несущих HER2-экспрессирующие ксенографты SKOV3

Сочетание низкого поглощения печенью и селезенкой вместе с высоким накоплением опухолью, а также высокой цитотоксичности в исследованиях *in vitro* сделало конъюгат $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-ABD-MMAF}$ многообещающим кандидатом для оценки в экспериментальном терапевтическом исследовании в сравнении с изученным ранее $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Z}_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ (Xu T. et al., 2021).

Проведение экспериментальной терапии *in vivo* для оценки противоопухолевого эффекта группы конъюгатов с разными цитотоксическими агентами. Динамика изменения объема опухолей в виде средних значений объема опухоли для оцениваемых групп представлена на рисунке 9. В контрольных группах кривые характеризовались резким углом наклона, в то время как терапия конъюгатами приводила к уплощению кривых, что свидетельствует о замедлении развития опухолей.

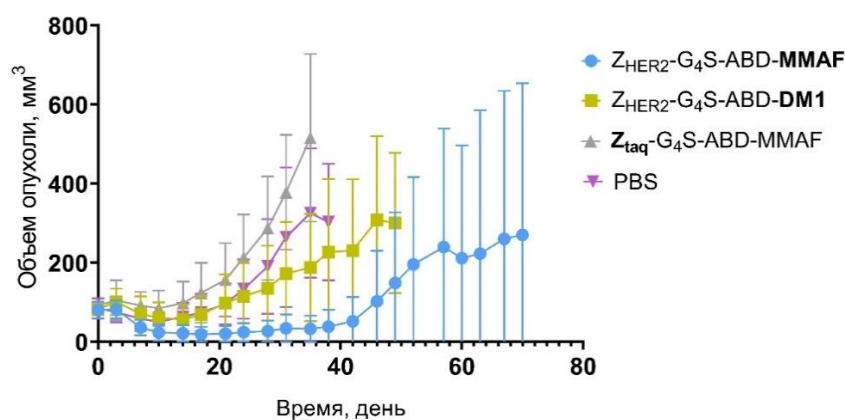


Рисунок 9 – Динамика изменения объема опухолей во время экспериментальной терапии ($M \pm SD$)

Результаты ANOVA теста изменения объема опухолей в ходе экспериментальной терапии представлены на рисунке 10. На 7 день у мышей, получавших $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$, опухоли

были значимо ($p < 0,01$) меньше по сравнению с контрольной группой $Z_{\text{Taq}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$. На 35 день исследования после четырех циклов терапии у мышей в группе $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$ наблюдались значимо ($p < 0,001$) меньшие опухоли по сравнению с контрольными группами. В контрольных группах наблюдался быстрый рост опухолей. Рост опухолей в группе $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$ и группе $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ был подавлен по сравнению с ростом опухолей в группе $Z_{\text{Taq}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$ и в группе PBS.

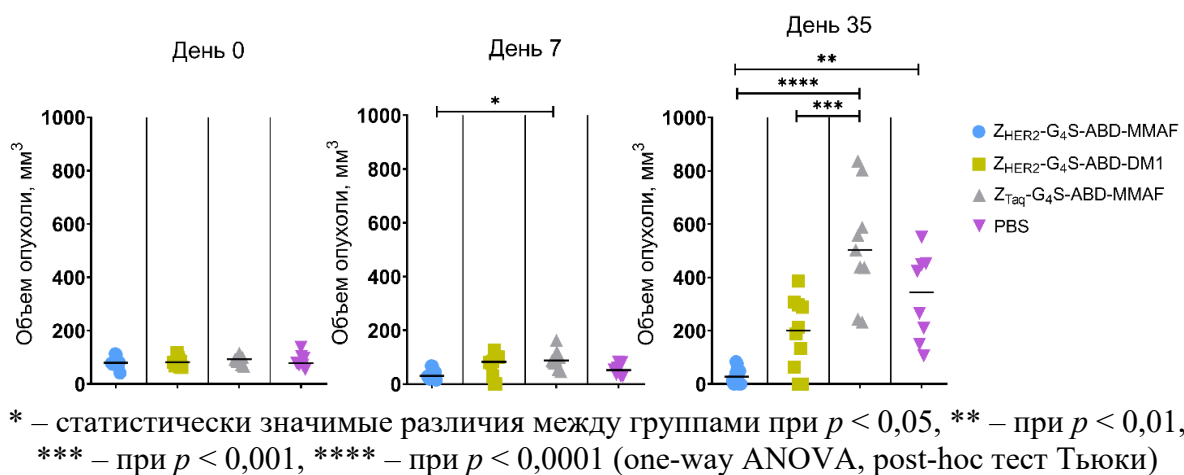


Рисунок 10 – ANOVA тест изменения объема опухолей в день 0, день 7 и день 35 экспериментальной терапии

Результаты оценки показателя торможения роста опухоли (ТРО), выраженные в процентах от среднего объема опухолей контрольной группы PBS (принятой за 100 %), свидетельствуют о существенном антипролиферативном эффекте в ходе терапии исследуемыми конъюгатами (рисунок 11). На 35 день исследования индекс ТРО для конъюгата $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$ составил 90 %, однако для конъюгата $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$ данный показатель определен значительно ниже и достиг 42 %. Полученные значения свидетельствуют о высоком и устойчивом торможении роста новообразований для конъюгата $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-MMAF}$ в сравнении с контрольными группами и терапией конъюгатом $Z_{\text{HER2}}\text{-G}_4\text{S-ABD-DM1}$.

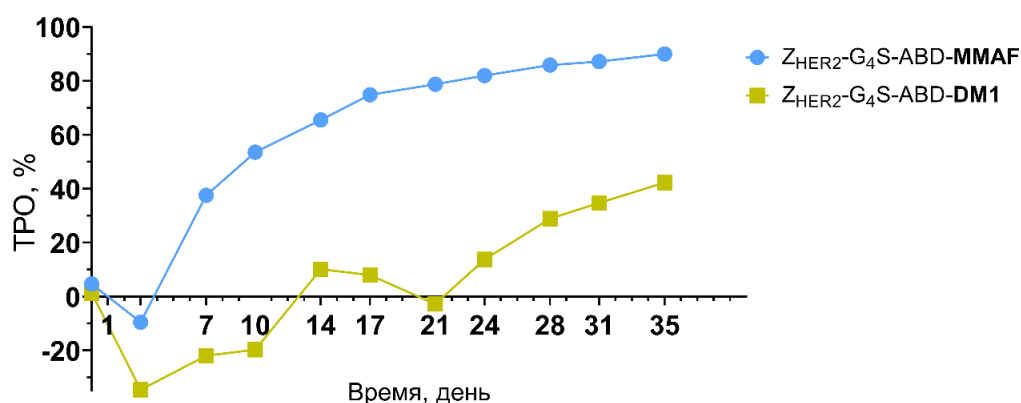
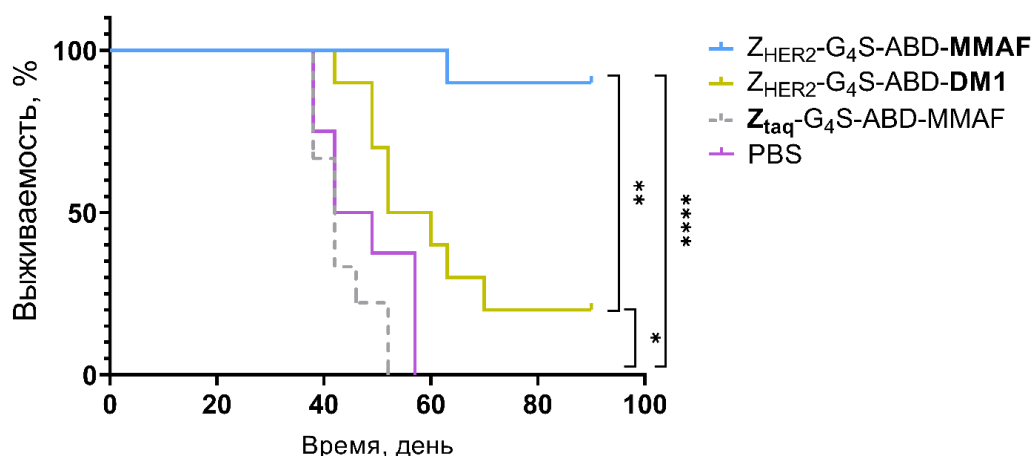


Рисунок 11 – Динамика индекса торможения роста опухоли (ТРО) во время экспериментальной терапии. Результаты представлены в виде процентов от среднего объема опухолей контрольной группы (PBS), принятого за 100 %

Анализ и построение кривых выживаемости в эксперименте проводились по методу оценки Каплана–Майера с использованием логрангового критерия Мантеля–Кокса, результаты представлены на рисунке 12. Медиана выживаемости и увеличение медианной продолжительности жизни (УПЖ) мышей линии Nu/J во время экспериментальной терапии

представлены в таблице 3. В контрольных группах все мыши характеризовались экспоненциальным ростом опухоли и были подвергнуты эвтаназии в периоде между 35 и 57 днями исследования. Анализ показал значимое ($p < 0,0001$) увеличение медианы выживаемости для группы конъюгата, содержащего цитотоксический агент монометилауристин F, $Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$, по сравнению с контрольными группами, а также по сравнению с группой конъюгата, содержащего эмтанзин, $Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$ ($p < 0,01$). Медиана выживаемости для группы $Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$ достоверно ($p < 0,05$) выше по сравнению с контрольными группами. Показатель УПЖ для группы $Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$ составил 28 %, для группы $Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$ не был определен ввиду недостигнутой медианы выживаемости. Полученные данные демонстрируют наиболее высокую терапевтическую эффективность $Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$ в сравнении с $Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$ и контрольными группами.



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

Рисунок 12 – Кривые выживаемости мышей по методу Каплана–Майера с использованием логрангового критерия Мантеля–Кокса

Таблица 3 – Время удвоения опухоли, медиана выживаемости и увеличение медианной продолжительности жизни мышей линии Nu/J во время экспериментальной терапии (за 100 % принят показатель контрольной группы PBS)

Исследуемая группа	Время удвоения опухоли, дни	Медиана выживаемости, дни	Увеличение медианной продолжительности жизни, УПЖ, %
$Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$	31 (95 % ДИ 21–49)	Не достигнута	Не определено
$Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$	19 (95 % ДИ 14–25)	56	28
$Z_{Taq-G4S-ABD-MMAF}$	10 (95 % ДИ 8–12)	42	- 0,08
PBS	12 (95 % ДИ 9–16)	46	0

На момент окончания исследования (90 дней) в группе $Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$ 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 $Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$ 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 животных между группами, что указывает на хорошую

переносимость терапии. Патологическое исследование не обнаружило макроскопических поражений в печени или почках.

В текущем исследовании $Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$ 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 $Z_{Taq-G4S-ABD-MMAF}$ наблюдался экспоненциальный рост опухолей без видимого противоопухолевого эффекта. В группе $Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$ 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 G₄S, (G₃S)₃, (S₃G)₃, слитого с полипептидными фрагментами ABD, PAS или XTEN и конъюгированного с цитотоксическими агентами DM1, MMAE или MMAF и произведена идентификация и оценка качества.

В исследованиях *in vitro* наиболее высокоактивные цитотоксические свойства проявил цитотоксический агент MMAF в составе конъюгата $Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$. 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 субнанолярном диапазоне и K_{d2} со сродством в нанолярном диапазоне.

Для всех исследуемых конъюгатов характерен почечный клиренс. Конъюгаты, содержащие линкеры с повторами серина, значимо снижали поглощение в печени по сравнению с конъюгатом с линкером G₄S. 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, [^{99m}Tc]Tc- $Z_{HER2-ABD-DM1}$ показал наилучшие соотношения активности опухоль-орган. Среди конъюгатов с разными цитотоксическими агентами накопление в опухоли значимо выше для [^{99m}Tc]Tc- $Z_{HER2-ABD-MMAF}$, по сравнению с [^{99m}Tc]Tc- $Z_{HER2-ABD-MMAE}$ и [^{99m}Tc]Tc- $Z_{HER2-ABD-DM1}$, так же, как и накопление активности в нецелевых органах.

Экспериментальная терапия на BALB/c nu/nu мышах, несущих ксенографты аденокарциномы яичников SKOV3, показала, что рост опухоли в группе $Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$ и группе $Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$ значимо ингибируется по сравнению с ростом опухоли в контрольных группах, но эффективнее в группе $Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$. Медиана общей выживаемости значимо выше для группы $Z_{HER2-G4S-ABD-MMAF}$, чем для остальных трех сравниваемых групп, а также выше для $Z_{HER2-G4S-ABD-DM1}$ по сравнению с двумя контрольными группами.

Конъюгаты Z_{HER2}-G₄S-ABD-**ММАF** и Z_{HER2}-G₄S-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 высокоаффинного каркасного белка аффибоди, содержащего междоменные глицин-сериновые линкеры G₄S, (G₃S)₃, (S₃G)₃, слитого с полипептидными фрагментами ABD, PAS или XTEN и конъюгированного с цитотоксическими агентами DM1, MMAE или MMAF, с чистотой свыше 95 %.

2. При изучении функциональной пригодности исследуемых терапевтических HER2-направленных конъюгатов *in vitro* установлены высокоактивные цитотоксические свойства всех конъюгатов на HER2-позитивных клеточных линиях SKOV3, SKBR3 и AU565 со значениями IC₅₀ в наномолярном диапазоне и наибольшим цитотоксическим действием конъюгата Z_{HER2}-G₄S-ABD-**ММАF**. Установлены HER2-опосредованное специфичное связывание всех конъюгатов и высокая аффинность связывания с HER2 всех конъюгатов со значениями константы равновесной диссоциации (K_d) в диапазоне от субнаномолярного до низкого наномолярного. Установлена медленная HER2-опосредованная интернализация 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 (G₃S)₃ и (S₃G)₃, значимое увеличение периода полувыведения конъюгатов, содержащих полипептидные фрагменты с XTEN576, PAS600 и ABD₀₃₅.

4. Установлено HER2-опосредованное специфичное опухолевое поглощение *in vivo* в ксенографтах аденокарциномы яичников SKOV3 для всех конъюгатов с наиболее высокими соотношениями «опухоль-орган» для [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-G₄S-ABD-DM1 в группе конъюгатов с различными полипептидами, увеличивающими период полувыведения, и конъюгата [^{99m}Tc]Tc-Z_{HER2}-G₄S-ABD-**ММАЕ** в группе конъюгатов с разными цитотоксическими агентами.

5. Установлено, что Z_{HER2}-G₄S-ABD-**ММАF** 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}-G₄S-ABD-**ММАF** имеет большую эффективность, по сравнению с конъюгатом Z_{HER2}-G₄S-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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ

1. Xu, T. Effect of Inter-Domain Linker Composition on Biodistribution of ABD-Fused Affibody-Drug Conjugates Targeting HER2 / T. Xu, J. Zhang, M. Oroujeni, M.S. Tretyakova, **V. Bodenko**, M.V. Belousov, A. Orlova, V. Tolmachev, A. Vorobyeva, T. Gräslund // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, № 3. – P. 522.

2. Yin, W. Comparison of HER2-targeted affibody conjugates loaded with auristatin- and maytansine-derived drugs / W. Yin, T. Xu, H. Ding, J. Zhang, **V. Bodenko**, M.S. Tretyakova, M.V. Belousov, Y. Liu, M. Oroujeni, A. Orlova, V. Tolmachev, T. Gräslund, A. Vorobyeva // *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. – 2023. – Vol. 355. – P. 515–527.

3. Zhang, J. Half-life extension via ABD-fusion leads to higher tumor uptake of an affibody-drug conjugate compared to PAS- and XTENylation / J. Zhang, **V. Bodenko**, M. Larkina, E. Bezverkhniaia,

T. Xu, Y. Liao, A. Abouzayed, E. Plotnikov, M. Tretyakova, F. Yuldasheva, M. Belousov, A. Orlova, V. Tolmachev, T. Gräslund & A. Vorobyeva // Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society. – 2024. – Vol. 370. P. 468–478.

4. **Боденко В.В.** Молекулярные мишени таргетной терапии злокачественных новообразований / В.В. Боденко, М.С. Ларькина, А.А. Прач, Е.В. Плотников, М.В. Белоусов, В.И. Чернов // Бюллетень сибирской медицины. – 2024. – Т. 24, № 2. – С.101–113.

5. **Боденко, В.В.** 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. 25, №3. – С.135–148.

ТЕЗИСЫ В МАТЕРИАЛАХ МЕЖДУНАРОДНЫХ И РОССИЙСКИХ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. **Боденко, В. В.** Контроль специфичности связывания конъюгата аффибоди $Z_{HER2}-(G_3S)_3$ -ABD-DM1 с HER-2 экспрессирующей клеточной линией SCOV3 *in vitro* / В. В. Боденко // Химия и химическая технология в XXI веке : Материалы XXIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера. В 2-х томах, Томск, 16–19 мая 2022 года. Том 1. – Томск: Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 2022. – С. 419-420.

2. **Боденко, В. В.** Сравнение *in vitro* конъюгатов аффибоди для HER-2 терапии, содержащих альбумин-связывающий домен и полипептид PAS / В. В. Боденко // Перспективы развития фундаментальных наук : Сборник научных трудов XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Томск, 25–28 апреля 2023 года. – Томск: Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 2023. – С. 21-23.

3. **Боденко, В. В.** Оценка интернализации *in vitro* таргетных терапевтических препаратов, нацеленных на рецептор HER-2 / В. В. Боденко // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье : Материалы XXVI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей, Санкт-Петербург, 22 апреля 2023 года / под редакцией А. М. Сараны [и др.]. Том XXVI. – Санкт-Петербург : Общество с ограниченной ответственностью Издательский дом «Сциентиа», 2023. – С. 675-676.

4. **Боденко, В. В.** Оценка *in vitro* новых таргетных терапевтических препаратов на основе Affibody, нацеленных на рецептор HER-2 / В. В. Боденко // Химия и химическая технология в XXI веке : Материалы XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 85-летию со дня рождения профессора А.В. Кравцова, Томск, 15–19 мая 2023 года. Том 1. – Томск: Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 2023. – С. 490-491.

5. **Боденко, В. В.** Сравнительная оценка *in vivo* новых HER-2 направленных таргетных терапевтических конъюгатов на основе аффибоди и эмтанзина / В.В. Боденко // Всероссийская конференция с международным участием «Молодые лидеры в медицинской науке», Томск, 17-18 мая 2023 года. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2023. – С. 164-167.

6. Оценка влияния полипептидных фрагментов, увеличивающих период полувыведения, на биораспределение *in vivo* HER-2 направленных таргетных терапевтических конъюгатов на основе малых каркасных белков / **В.В. Боденко**, М.В. Белоусов, В.И. Чернов // III Международная научно-практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы», Томск, 18-20 сентября 2024 года. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2024. – С. 159-162.

7. Доклиническая оценка *in vivo* новых таргетных терапевтических конъюгатов на основе Affibody, нацеленных на рецептор HER-2 / **В.В. Боденко**, М.С. Ларькина, М.В. Белоусов, В.И. Чернов, В.М. Толмачев // Медицинские и экологические эффекты ионизирующего излучения : материалы VIII Международной научно-практической конференции, Томск, 09–11 сентября 2025 года. – Томск : ООО «АлКом», 2025. – С. 158-159.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- % ВД/г – процент введенной дозы на грамм
ADCC – антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность
IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования
OD₆₀₀ – 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
SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis – гель-электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
TCPEP – Tris-(2-CarboxyEthyl)Phosphine, Hydrochloride) – трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид
WST-8 – (2-(2-метокси-4-нитропентил)-3-(4-нитропентил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2Н-тетразолиум)
БСА – бычий сывороточный альбумин
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
мкАТ – моноклональное антитело
ОФ-ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
Радио-ТСХ – тонкослойная радиохроматография
ТРО – индекс торможения роста опухоли
ТФА – трифторуксусная кислота
УПЖ – увеличение медианной продолжительности жизни