

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**

**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова**

**Российской академии наук**

---

На правах рукописи

Шилова Ольга Николаевна

**Создание адресных противораковых агентов на основе ERBB2-специфичного белка  
DARPin 9-29**

Специальность 03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

проф., д.б.н., академик РАН, Деев Сергей Михайлович

Москва – 2019

## Оглавление

Оглавление.....	2
Введение .....	5
ГЛАВА I. Обзор литературы .....	14
1.1. Таргетная терапия ERBB2-положительных опухолей.....	14
1.1.1. Моноклональные ERBB2-специфичные антитела и низкомолекулярные ингибиторы, используемые для таргетной терапии .....	17
1.1.2. Разработка таргетных препаратов на основе альтернативных скаффолдов .....	21
1.2. Использование особенностей строения дарпинов в исследованиях и биотехнологии...	23
1.3. Применение дарпинов в качестве связывающих модулей .....	27
1.4. Опухолеспецифические токсины на основе дарпинов.....	29
1.5. Применение дарпинов в адресной фотодинамической терапии .....	31
1.6. Применение дарпинов для доставки наночастиц .....	34
1.7. Применение дарпинов для создания онколитических вирусов.....	36
1.8. Применение дарпинов для создания химерных антигенных рецепторов .....	37
1.9. Заключение .....	39
ГЛАВА II. Материалы и методы .....	40
2.1. Нарботка и выделение рекомбинантных белков.....	40
2.1.1. Получение бактериальных компетентных клеток .....	40
2.1.2. Трансформация компетентных клеток .....	41
2.1.3. Экспрессия целевых белков в бактериальной системе .....	41
2.1.4. Хроматографическая очистка белков .....	42
2.1.5. Электрофорез полученных фракций белка в денатурирующем ПААГ и визуализация .....	42
2.2. Определение специфичности связывания рекомбинантных белков на основе DARPIn 9-29 с ERBB2-положительными опухолевыми клетками методом проточной цитофлуориметрии .....	43
2.2.1. Конъюгация белка DARPIn 9-29 с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) .....	44

2.2.2. Взаимодействие белков с поверхностью клеток.....	44
2.2.3. Взаимодействие белка DARP-miniSOG с клетками SK-BR-3 в присутствии конкурирующего полипептида DARPin 9-29.....	45
2.3. Определение специфической цитотоксичности адресных токсинов на основе DARPin 9-29.....	45
2.3.1. Определение специфической цитотоксичности белка DARPin-miniSOG .....	46
2.4. Оценка скорости интернализации комплекса ERBB2 с DARPin-miniSOG методом проточной цитофлуориметрии .....	47
2.5. Изучение рециклизации рецептора после интернализации комплекса ERBB2/DARPin-miniSOG методом проточной цитофлуориметрии .....	48
2.6. Изучение интернализации белка DARPin-miniSOG в составе комплекса с рецептором ERBB2 и его внутриклеточной локализации методом конфокальной микроскопии .....	49
2.7. Установление причин снижения интенсивности флуоресценции белка DARPin-miniSOG в эндосоме .....	49
2.8. Установление механизма клеточной гибели клеток, подвергнутых воздействию адресных токсинов на основе DARPin .....	50
2.9. Оценка противораковой эффективности, общей токсичности и иммуногенности белков на основе DARPin 9-29 <i>in vivo</i> .....	51
2.9.1. Животные.....	51
2.9.2. Схемы введения адресных токсинов DARPin-PE40 и DARPin-LoPE .....	52
2.9.3. Оценка неспецифической токсичности адресных токсинов .....	53
2.9.4. Оценка иммуногенности адресных токсинов .....	54
ГЛАВА III. Результаты и обсуждение .....	56
3.1. Выделение и характеристика белка DARPin.....	56
3.2. Выделение и характеристика рекомбинантного белка DARPin-mCherry .....	57
3.3. Выделение и характеристика рекомбинантного белка DARPin-miniSOG .....	59
3.3.1. Нарботка и выделение белка DARPin-miniSOG .....	59
3.3.2. Подтверждение способности рекомбинантного белка DARPin-miniSOG специфично связываться с клетками методом проточной цитофлуориметрии .....	60
3.3.3. Определение токсичности DARPin-miniSOG в отношении ERBB2-положительных клеток .....	62

3.3.4. Установление механизма гибели клеток, подвергнутых воздействию адресного фототоксина DARPin-miniSOG .....	64
3.3.5. Подтверждение интернализации комплекса DARPin-miniSOG с рецептором ERBB2 методом проточной цитофлуориметрии.....	66
3.3.6. Оценка вклада рециклизации в восстановление исходного количества рецептора на мембране после интернализации комплекса ERBB2/DARPin-miniSOG.....	69
3.3.7. Изучение интернализации белка DARPin-miniSOG в составе комплекса с рецептором ERBB2 и его колокализации с лизосомами с помощью конфокальной микроскопии .....	71
3.3.8. Сравнение скорости интернализации DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG.....	72
3.3.9. Установление механизма гашения miniSOG в эндосомах.....	74
3.4. Противораковая активность белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE <i>in vitro</i> .....	77
3.4.1. Токсичность белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE <i>in vitro</i> .....	78
3.4.2. Механизм клеточной гибели.....	79
3.5. Оценка эффективности DARPin-PE40 и DARPin-LoPE на ксенографтных моделях рака .....	80
3.6. Токсичность и иммуногенность адресных токсинов DARPin-LoPE и DARPin-PE40 ....	82
3.6.1. Исследование общей токсичности DARPin-PE40 и DARPin-LoPE.....	83
3.6.2. Исследование иммуногенности DARPin-PE40 и DARPin-LoPE.....	87
Заключение .....	90
Выводы: .....	92
Список литературы .....	94
Благодарности .....	109

## Введение

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Клеточный рецептор ERBB2 (HER2/neu) – трансмембранный белок семейства рецепторов эпидермального фактора роста, который играет важную роль в нормальном развитии и дифференцировке клеток, однако при избыточной экспрессии обеспечивает раковым клеткам сигналы выживания и пролиферации, поддерживая агрессивные свойства опухоли. Гиперэкспрессия ERBB2 характерна для целого ряда распространенных опухолей, таких как рак молочной железы, желудка, простаты, легких, яичников и др. и, как правило, ассоциирована со злокачественностью и плохим прогнозом для пациента. Вовлечение сигнальных путей ERBB2 в канцерогенез в первую очередь характерно для рака груди: гиперэкспрессия ERBB2 обнаруживается в 20-30% опухолей молочной железы [Ménard и др., 2000]. Стоит отметить, что рак молочной железы является самым частым типом рака у женщин по всему миру и становится самой частой причиной смерти от рака среди женщин. Больше всего случаев рака молочной железы наблюдается в развитых странах, однако в связи с увеличивающейся урбанизацией, повышением уровня жизни и распространения западного стиля жизни в развивающихся странах заболеваемость раком груди также растет [Bray и др., 2018].

Количественный уровень ERBB2 используется как один из диагностических параметров, определяющих прогноз течения заболевания и схему лечения [Loibl, Gianni, 2017]. Определение уровня экспрессии ERBB2, как правило, проводится по материалу, полученному путем биопсии опухоли и сторожевых лимфоузлов, методами иммуногистохимии и флуоресцентной гибридизации *in situ*. Недостатками такого подхода являются нежелательность многократного анализа из-за высокой инвазивности ERBB2-положительных опухолей и вероятность ложноотрицательных результатов, причинами которых могут быть ошибки при проведении теста и гетерогенность экспрессии ERBB2 как внутри опухоли, так и при образовании метастазов [Perez и др., 2006]. В результате до 20% оценок ERBB2 статуса оказываются неточными [Wolff и др., 2007]. Поскольку уровень экспрессии ERBB2 важен для постановки диагноза и выбора лечения, создание диагностических и тераностических агентов для детекции и визуализации ERBB2-положительного рака является важной биомедицинской проблемой.

Так как избыточная экспрессия рецептора ERBB2, с одной стороны, отличает раковые клетки от здоровых, с другой стороны, определяет агрессивные свойства опухоли, для лечения ERBB2-положительного рака были разработаны таргетные препараты: терапевтические моноклональные антитела или их конъюгаты и низкомолекулярные ингибиторы

внутриклеточных сигнальных путей. Использование адресных ERBB2-специфичных агентов в комбинации с химиотерапией или в виде неоадьювантной терапии, предваряющей и дополняющей радиотерапию и оперативное удаление опухоли, значительно улучшают выживание пациенток с ERBB2-положительным раком молочной железы [Wuerstlein, Harbeck, 2017]. Однако ограниченный цитотоксический эффект самих антител редко позволяет достичь полного излечения [Balduzzi и др., 2014]. Это может быть связано с высокой генетической нестабильностью опухолевых клеток: быстрое накопление мутаций в их геноме меняет фенотип клеток, делая их менее восприимчивыми к терапии. В связи с этим поиск новых таргетных препаратов продолжается, и в последние годы спектр используемых молекул расширился за счет альтернативных связывающих белков. За счет меньшего размера они проникают в опухоли лучше, чем терапевтические антитела, а их совместимость с бактериальными и дрожжевыми системами экспрессии позволяет снизить стоимость производства. Адресные агенты с разными физико-химическими свойствами, узнающими разные молекулы опухолевых клеток или их разные эпитопы и воздействующие на перерожденные клетки при помощи различных механизмов позволили бы создать набор инструментов для персонализированной медицины.

В данной работе применяется подход, позволяющий создавать ERBB2-специфичные диагностические и терапевтические молекулы заданной стехиометрии за счет использования генетически кодируемого модуля DARPIn 9-29. Это искусственный высокоаффинный функциональный аналог антител, который можно объединять с эффекторными модулями в виде белков слияния, а его физико-химические свойства позволяют легко нарабатывать полученные рекомбинантные белки в бактериальной системе экспрессии.

### **Цели и задачи:**

**Целью** работы являлось получение и всестороннее исследование ряда адресных противораковых агентов на основе ERBB2-специфичного белка DARPIn 9-29 и других функционально активных белков. В рамках данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести сравнительное исследование способности рекомбинантного DARPIn 9-29 связываться с рецептором опухолевых клеток ERBB2 как в свободном виде, так и в составе ряда белков слияния, включающих флуоресцентный белок mCherry, фототоксин miniSOG, производные белкового экзотоксина A.

2. Выделить и исследовать белок слияния на основе адресного ERBB2-специфичного белка DARPIn 9-29 и фототоксичного белка miniSOG. Изучить цитотоксическое действие белка DARPIn-miniSOG в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих клеток *in vitro*.
3. Провести сравнительное исследование рецептор-опосредованной интернализации рекомбинантных белков на основе адресных ERBB2-специфичных модулей DARPIn 9-29 и 4D5scFv в опухолевых клетках с гиперэкспрессией рецептора ERBB2.
4. Изучить цитотоксическое действие белков DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих клеток *in vitro* и их противоопухолевый эффект *in vivo*.
5. Исследовать системную токсичность и иммуногенность адресных противораковых агентов DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE, сконструированных на основе ERBB2-специфичного белка DARPIn 9-29.

### **Научная новизна работы**

Впервые на основе адресного ERBB2-специфичного белка DARPIn 9-29 сконструирован и всесторонне изучен ряд новых функционально активных белков, предназначенных для диагностики и терапии ERBB2-положительных опухолей и проанализирована совместимость данных эффекторных модулей с DARPIn 9-29. Сконструированные белки DARPIn-mCherry, DARPIn-miniSOG, DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE, в состав которых наряду с адресным белком DARPIn 9-29 входят флуоресцентный белок mCherry, фототоксин miniSOG и производные белкового экзотоксина А, наработаны в бактериальной системе экспрессии, очищены и охарактеризованы физико-химическими и иммунохимическими методами. Для всех указанных белков подтверждена способность специфически и высокоселективно связываться с поверхностью ERBB2-гиперэкспрессирующих раковых клеток. Для адресных токсинов DARPIn-miniSOG, DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE показана высокая избирательная токсичность в отношении ERBB2-положительных опухолевых клеток и изучены механизмы их действия на клетки-мишени. Проведено исследование неспецифической токсичности и иммуногенности белков DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE. Флуоресцентные свойства белка miniSOG в составе адресных ERBB2-специфичных токсинов впервые использованы для сравнительного изучения динамики интернализации клеточного рецептора ERBB2 в комплексе с адресными противораковыми белками.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Классический подход к таргетной терапии рака подразумевает использование антител или их фрагментов в качестве адресной молекулы для специфического и селективного связывания с опухолевыми клетками определенного молекулярного профиля и последующего подавления роста опухоли. В данной работе всесторонне изучен альтернативный вариант адресного полипептида – искусственно полученный на основе анкириновых повторов DARPIn 9-29, обладающий высоким сродством к укороченному внеклеточному домену ERBB2. Показано, что DARPIn 9-29 может успешно использоваться как альтернативный адресный модуль для доставки токсинов и визуализирующих агентов к ERBB2-положительным раковым клеткам. Полученный в ходе работы белок DARPIn-miniSOG позволил отследить динамику интернализации ERBB2 и оценить скорость рециклизации рецептора. Проведено сравнение скорости интернализации ERBB2 в комплексе с белками 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG. Эти данные имеют большое значение для выбора конкретного адресного полипептида при конструировании таргетных соединений различного состава и механизма действия.

Полученные в ходе работы адресные токсины DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE эффективно подавляют рост опухолей в ксенографтных мышинных моделях и могут служить для создания таргетных противораковых препаратов.

## **Методология и методы исследования**

Методология работы основана на применении широкого спектра современных методов белковой инженерии, биотехнологии, клеточной биологии и медицины. Исследуемые в работе белки DARPIn 9-29, DARPIn-mCherry, DARPIn-miniSOG, DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE нарабатывали в бактериальной системе экспрессии и выделяли стандартными методами аффинной и ионообменной хроматографии. Для изучения взаимодействия белков с раковыми клетками и для исследования механизмов действия адресных токсинов применяли методики с использованием флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. В данной работе было впервые использовано экранирование и поглощение флуоресценции miniSOG для изучения динамики интернализации рецептора ERBB2 в комплексе с противораковыми агентами на основе DARPIn 9-29 и 4D5scFv методом проточной цитометрии.

Токсичность противораковых агентов DARPIn-miniSOG, DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE *in vitro* оценивали количественно при помощи колориметрического МТТ-теста [Mosmann, 1983].



Противораковую активность белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE оценивали на ксенографтных моделях ERBB2-положительных опухолей: аденокарциномы молочной железы [Sokolova и др., 2016] и рака яичника [Sokolova и др., 2019]. Оценку объема опухоли проводили как классическим способом измерения диаметра подкожного ксенографта, так и инновационным неинвазивным способом визуализации флуоресцентного ксенографта *in vivo*.

Сравнение общей токсичности и иммуногенности белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE проводили на здоровых иммунокомпетентных мышах линии BALB/c, поскольку большинство иммунодоминантных эпитопов псевдомонадного экзотоксина совпадают для человека и мышей данной линии [Liu и др., 2012]. Белки вводили двумя курсами для моделирования повторного лечения, которое часто оказывается нежелательным или неэффективным из-за образования нейтрализующих антител к белковым препаратам. В ходе эксперимента состояние животных оценивали визуально и по физиологическим параметрам, измеряемым лабораторными методами, по окончании опыта было проведено гистологическое исследование органов подопытных животных.

Обработку численных параметров проводили при помощи программного обеспечения для соответствующих исследовательских приборов, статистическую обработку результатов проводили при помощи программ Microsoft Excel и Graph Pad Prism.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Показано, что белок DARPin 9-29 в составе рекомбинантных белков, включающих функционально активные белки mCherry, фототоксин miniSOG, производные белкового экзотоксина A, сохраняет способность селективно связываться с ERBB2 на поверхности опухолевых клеток. За счет малого размера, высокой растворимости и отсутствия дисульфидных связей DARPin 9-29 является перспективным адресным модулем для создания противоопухолевых рекомбинантных белков, продуцируемых в бактериальной системе экспрессии.
2. Всесторонне исследован адресный белковый фототоксин на основе DARPin 9-29 и фототосенсибилизатора miniSOG. Показано, что адресный белковый фототоксин DARPin-miniSOG избирательно уничтожает ERBB2-гиперэкспрессирующие клетки под действием синего света, индуцируя в них некроз.

3. Показано, что комплекс DARPin-miniSOG/ERBB2 интернализуется, при этом скорость интернализации DARPin-miniSOG/ERBB2 выше, чем у 4D5scFv-miniSOG/ERBB2. Показано, что цитотоксичность белка miniSOG в составе рекомбинантных белков с адресными модулями зависит от скорости интернализации этих белков в комплексе с ERBB2.
4. Адресные токсины DARPin-PE40 и DARPin-LoPE вызывали апоптоз ERBB2-гиперэкспрессирующих раковых клеток *in vitro* в пикомолярном диапазоне концентраций. Белки DARPin-PE40 и DARPin-LoPE эффективно подавляли рост ксенографтных опухолей *in vivo*. Таким образом, способность белков на основе DARPin 9-29 вызывать быструю интернализацию ERBB2, может эффективно использоваться для внутриклеточной доставки противораковых токсинов на основе экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*.

### **Апробация результатов**

Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (2017, 2018, Москва, Россия); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014», «Ломоносов-2016», «Ломоносов-2018» (2014, 2016, 2018, Москва, Россия); XXVIII, XIX и XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2016, 2017, 2018, Москва, Россия); Объединенный научный форум Международная научная конференция «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2017, Москва, Россия), II Объединенный научный форум IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2019, Сочи-Дагомыс, Россия).

По материалам работы опубликовано 11 статей в рецензируемых журналах и 12 тезисов.

### **Статьи в рецензируемых журналах:**

1. Sokolova E.A., **Shilova O.N.**, Kiseleva D.V., Schulga A.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. HER2-specific targeted toxin DARPin-LoPE: immunogenicity and antitumor effect on intraperitoneal ovarian cancer xenograft model. // International Journal of Molecular Sciences. 2019. Т. 20. №10. С. E2399.
2. **Shilova O.N.**, Shilov E.S., Lieber A., Deyev S.M. Disassembling a cancer puzzle: Cell junctions and plasma membrane as targets for anticancer therapy. // Journal of Controlled Release. 2018. № 286. С. 125-136.

3. Кузичкина Е.О., **Шилова О.Н.**, Деев С.М. Механизм тушения флуоресценции белковых фотосенсибилизаторов на основе miniSOG в процессе интернализации рецептора HER2. // Acta Naturae. 2018. Т. 10. №4. С. 87-94.
4. Прошкина Г.М., Киселева Д.В., **Шилова О.Н.**, Рябова А.В., Шрамова Е.И., Стрёмовский О.А., Деев С.М. Бифункциональный токсин Darp-LoPE на основе HER2-специфичного инновационного модуля неиммуноглобулиновой природы как перспективный агент для тераностики. // Молекулярная биология. 2017. Т. 51. №6. С. 997-1007.
5. Shilova O.N., **Shilov E.S.**, Deyev S.M. The effect of trypan blue treatment on autofluorescence of fixed cells. // Cytometry part A. 2017. Т. 91. № 9. С. 917-925.
6. **Шилова О.Н.**, Прошкина Г.М., Рябова А.В., Деев С.М., Петров Р.В. Цитотоксичность адресных HER2-специфичных фототоксинов на основе флавопротеида miniSOG определяется скоростью их интернализации. // Доклады академии наук, 2017. Т 475. №1. С. 106-109.
7. Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., **Shilova O.**, Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPIn possesses a strong selective cytotoxic effect *in vitro* and a potent antitumor activity *in vivo*. // Journal of Controlled Release. 2016. № 233. С. 48-56.
8. **Шилова О.Н.**, Прошкина Г.М., Рябова А.В., Деев С.М. Анти-HER2-фототоксин на основе флавопротеида miniSOG вызывает окислительный стресс и некроз HER2-положительных раковых клеток. // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2016. № 1, С. 17–22.
9. **Шилова О.Н.**, Прошкина Г.М., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека. // Acta Naturae. 2015. Т. 7. №3. С. 126-132.
10. Proshkina G.M., **Shilova O.N.**, Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. A new anticancer toxin based on HER2/neu-specific DARPIn and photoactive flavoprotein miniSOG. // Biochimie. 2015. №118 С. 116-122.
11. Миронова К.Е., **Черных О.Н.**, Рябова А.В., Стрёмовский О.А., Прошкина Г.М., Деев С.М. Высокоспецифичный гибридный белок DARPIn-mCherry для флуоресцентной визуализации клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu. // Биохимия. 2014. Т. 79. №12. С. 1700-1706.

## Тезисы докладов на конференциях:

1. **Шилова О.Н.**, Киселева Д.В., Деев С.М. «ERBB2-специфичный белок DARPIn 9.29 показал низкую системную токсичность и иммуногенность». II Объединенный научный форум IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». 2019. Сочи – Дагомыс.
2. Кузичкина Е.О., **Шилова О.Н.**, Деев С.М. «Изменение токсических и флуоресцентных свойств адресных фотосенсибилизаторов на основе miniSOG при их интернализации с рецептором-мишенью». Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни». 2018. Москва.
3. Кузичкина Е.О., **Шилова О.Н.** «Изучение динамики интернализации рецептора HER2 при помощи рекомбинантных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG». Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018». 2018. Москва.
4. Киселева Д.В., **Шилова О.Н.** «Исследование общей токсичности и иммуногенности ERBB2-специфичного адресного токсина DARPIn-LoPE *in vivo*». Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018». 2018. Москва.
5. Кузичкина Е.О., **Шилова О.Н.**, Деев С.М. «Изучение динамики интернализации рецептора HER2 при помощи рекомбинантных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG». XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 2018. Москва.
6. **Шилова О.Н.**, Киселева Д.В., Деев С.М. «Исследование общей токсичности ERBB2-специфичного адресного токсина DARPIn-LoPE *in vivo*». XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 2018. Москва.
7. Souslova E.A., **Shilova O.N.**, Kuzichkina E.O., Deyev S.M. «Highly selective lentiviral delivery system of genetically encoded phototoxin into HER2-positive cancer cells». Объединенный научный форум Международная научная конференция «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» VII Российский симпозиум «Белки и пептиды». 2017. Москва.
8. **Шилова О.Н.**, Деев С.М. «Применение белкового модуля miniSOG для изучения интернализации клеточных рецепторов». Международный конгресс «Биотехнологии: состояние и перспективы развития». 2017. Москва.
9. **Шилова О.Н.**, Прошкина Г.М., Деев С.М. «Функциональное сравнение ERBB2-специфичных фотосенсибилизаторов на основе miniSOG». XXIX Зимняя молодежная

- научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 2017. Москва.
10. **Шилова О.Н.**, Прошкина Г.М., Рябова А.В., Деев С.М. «Адресный токсин на основе направляющего модуля DARPIn: изучение механизма клеточной гибели и внутриклеточной локализации». XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 2016. Москва.
  11. **Шилова О.Н.** «Температурозависимое изменение плотности рецептора ERBB2 на поверхности клеток SK-BR-3 в ответ на специфическое связывание фототоксина DARPIn-miniSOG». Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016». 2016. Москва.
  12. **Черных О.Н.** «Адресный фотосенсибилизатор DARPIn-miniSOG: получение и изучение функциональных свойств». Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014». 2014. Москва.

### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 194 источника. Работа изложена на 109 страницах и содержит 34 рисунка и 1 таблицу.

# ГЛАВА I. Обзор литературы

## 1.1. Таргетная терапия ERBB2-положительных опухолей

Концепция «магической пули», препарата, который селективно воздействует на очаг патологии, оставляя нетронутыми здоровые ткани, была исходно предложена Паулем Эрлихом для лечения инфекционных заболеваний. Для онкологических заболеваний реализация концепции Эрлиха столкнулась со значительными трудностями, поскольку раковые клетки отличаются от здоровых гораздо меньше, чем человеческие клетки отличаются от бактерий. Реализация этой концепции стала возможной благодаря разработке гибридной технологии получения моноклональных антител, описанной Кёлером и Мильштейном в 1975 году [Kohler, Milstein, 1975]. Моноклональные антитела стали использоваться как в научных исследованиях, так и в диагностике и лечении заболеваний, благодаря высокой аффинности и специфичности став той «магической пулей», на которой основана таргетная терапия, в том числе противоопухолевая.

Первые терапевтические моноклональные антитела были получены в 1986 году, на конец 2019 года американским управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) для клинического применения одобрено 82 моноклональных антитела, и это число продолжает расти. Таргетная терапия использует в качестве мишеней молекулы, которые появляются или избыточно экспрессируются на поверхности перерожденных клеток. Связывающиеся с ними адресные препараты способствуют уничтожению раковых клеток через антителозависимую цитотоксичность, блокировку клеточных сигналов, либо за счет избирательного накопления токсичных молекул в опухоли.

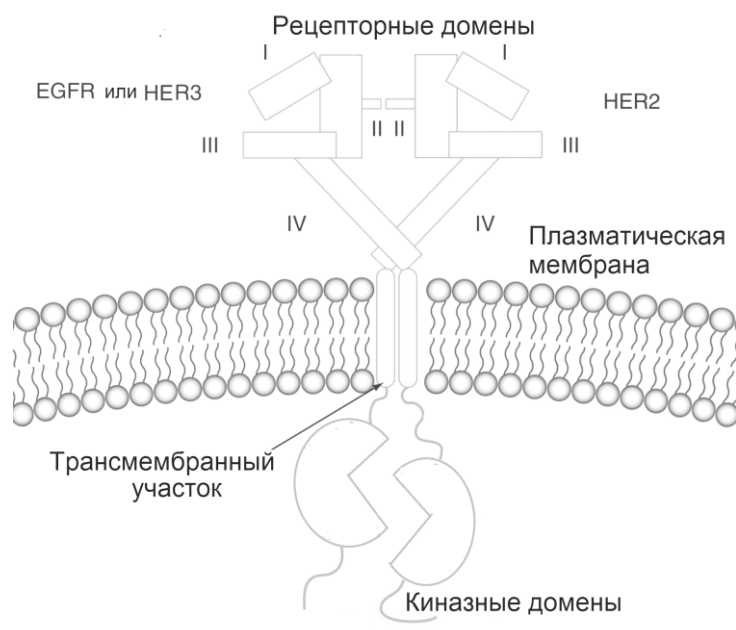
Одной из успешно используемых мишеней для таргетной терапии является молекула рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (ERBB2, HER2). Антиген ERBB2 избыточно экспрессируется в 20-30% опухолей молочной железы и яичников, определение уровня экспрессии ERBB2 включено в стандартные протоколы диагностики рака молочной железы [Ménard и др., 2000]. Молекула ERBB2 является трансмембранным тирозин-киназным рецептором, экспрессируемым в незначительном количестве на поверхности эпителиальных клеток человека. В норме ERBB2 участвует в различных внутриклеточных путях передачи сигнала: главным образом, стимулирует сигнальный путь HER3/PI3K/Akt и каскады митоген-активируемых протеин киназ (MAP) [Yarden, Sliwkowski, 2001], что приводит к пролиферации клеток.

Рецептор ERBB2 состоит из большой гликозилированной внеклеточной части, отвечающей за взаимодействие с лигандом и другими рецепторами семейства, одного трансмембранного домена, цитоплазматического домена с тирозин-киназной активностью и С-концевого участка, содержащего сайты фосфорилирования, участвующие в передаче регуляторных сигналов [Arteaga, Engelman, 2014; Поляновский, Лебедеко, Деев, 2012]. Внеклеточная область рецептора включает четыре домена (I-IV) (Рисунок 1). Домены I и III участвуют в связывании лиганда, домен II необходим для димеризации рецептора, домен IV, взаимодействует с доменом II, способствуя поддержанию димеризационного плеча в неактивной конформации, и таким образом, подавляет передачу сигнала от рецептора.

Связывание специфического лиганда с рецептором приводит к образованию гомо- или гетеродимеров. Для рецепторов ErbB1 (EGFR), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4) охарактеризованы их специфические лиганды. Рецептор ERBB2 (HER2) на данный момент относится к рецепторам-сиротам: уникального природного лиганда для него не найдено. Структурные исследования показали, что лиганд-связывающий сайт рецептора ERBB2 постоянно находится в активной конформации, и таким образом, склонен к гетеродимеризации и трансфосфорилированию через взаимодействие с другими лиганд-активированными рецепторами ErbB-семейства [Garrett и др., 2003].

Впервые ген *neu*, кодирующий этот белок, был идентифицирован при трансформации мышинных фибробластов ДНК, полученной из химически индуцированной нейробластомы крысы [Schechter и др., 1984; Shih и др., 1981]. Было показано, что найденный ген сходен с геном рецептора HER1. Вскоре был клонирован и человеческий ген, кодирующий белок, сходный по последовательности с HER1 и *v-erbB*, и совпадающий с онкогеном *neu* по хромосомной локализации [Coussens и др., 1985; Semba и др., 1985]. Амплификация этого гена была обнаружена в клеточных линиях, полученных из рака молочной железы, а затем и непосредственно в клетках опухоли. При этом среднее количество аллелей гена *ERBB2* может достигать 20-40 копий на одну опухолевую клетку. Исследования карцином молочной железы показывают избыточную экспрессию ERBB2 в 20-30% опухолей, и гиперэкспрессия этого рецептора коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациента [Slamon и др., 1987]. Амплификация гена *ERBB2* может наблюдаться также в клетках аденокарцином желудка и кишечника [Tal и др., 1988], карцином яичника [Bookman и др., 2003], эндометрия [Santin и др., 2008] и простаты [Zhang и др., 1998]. И хотя само по себе увеличение числа копий гена *ERBB2* не всегда вызывает гиперэкспрессию белка ERBB2, амплификация этого гена как правило

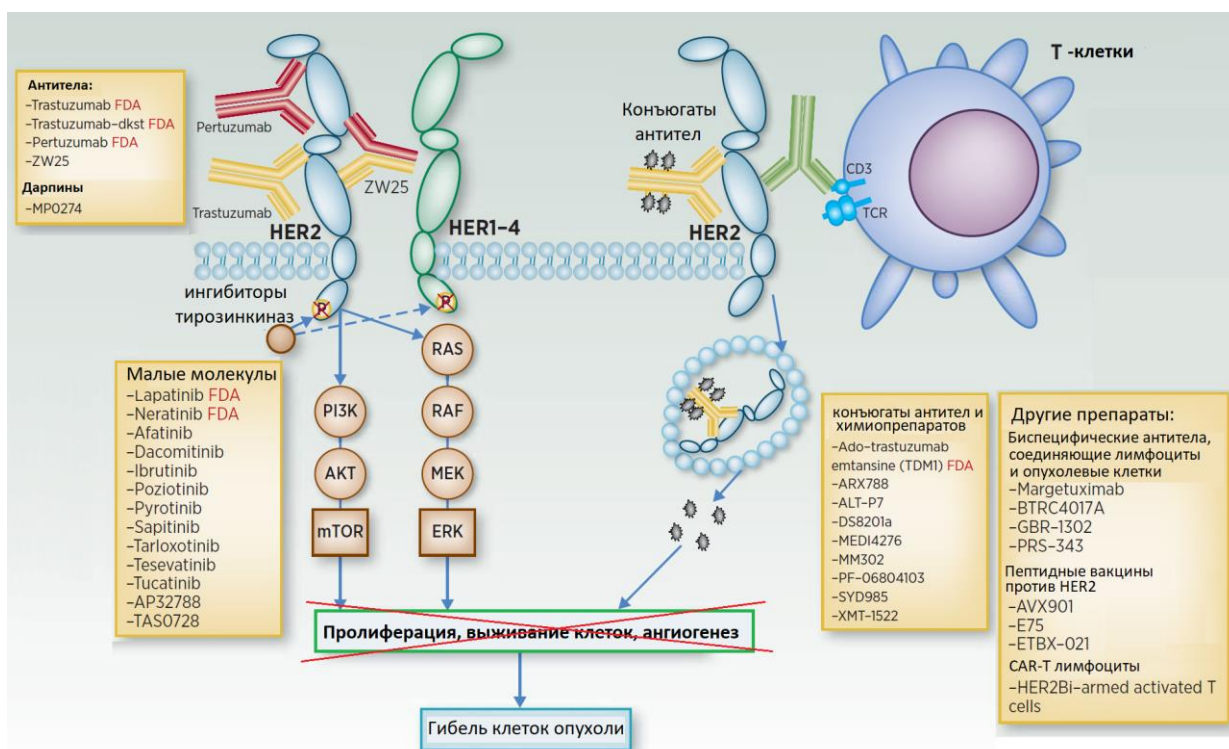
коррелирует с повышением митогенного сигнала от гетеродимеров ERBB2/ERBB3 [Deу и др., 2015].



**Рисунок 1. Схема строения гетеродимера HER2 и EGFR (или HER3). По Satyanarayananajois & Hill, 2011, с изменениями.**

В настоящий момент в терапии ERBB2-положительного рака применяются два мышиных гуманизированных антитела: трастузумаб (Herceptin, Roche-Genentech), связывающийся с субдоменом IV, и пертузумаб (Perjeta, Roche-Genentech), связывающийся с субдоменом II рецептора (см. рисунок 2) [Nahta, Hung, Esteva, 2004], а также трастузумаб, конъюгированный с ингибитором сборки микротрубочек (трастузумаб-эмтазин, Kadcyла, Roche) [Junttila и др., 2011]. Наряду с препаратами моноклональных антител для терапии ERBB2-положительного рака применяют два химических ингибитора тирозинкиназного домена лапатиниб (Tykerb или Tyverb, GlaxoSmithKlein) [Scaltriti и др., 2007] и нератиниб (Nerlynx, Pfizer) [Deeks, 2017]. Таргетные препараты, уже применяемые для терапии ERBB2-положительных опухолей и проходящие клинические испытания, перечислены на рисунке 2. Кроме того, исследователи пытаются усилить терапию таргетными препаратами с помощью пептидных вакцин и биспецифических антител, активирующих клетки иммунной системы и привлекающих их к борьбе с ERBB2-положительными опухолями.





**Рисунок 2.** ERBB2-специфичные таргетные препараты, одобренные или проходящие клинические испытания. FDA – препараты, одобренные американским управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов. По [Meric-Bernstam и др., 2019] с изменениями.

### 1.1.1. Моноклональные ERBB2-специфичные антитела и низкомолекулярные ингибиторы, используемые для таргетной терапии

Механизм действия моноклонального антитела пертузумаб в первую очередь включает в себя ингибирование димеризации ERBB2 с другими рецепторами семейства, что ослабляет активацию митогенного сигнала через сигнальные пути MAPK и PI3K/Akt, это приводит к остановке клеточного цикла, замедлению деления клеток и роста опухоли [Harbeck и др., 2013; Semba и др., 1985]. Кроме того как трастузумаб, так и пертузумаб опсонизируют раковые клетки и запускают опосредованную антителами цитотоксичность [Scheuer и др., 2009; Vu, Claret, 2012]. Еще одним из механизмов воздействия является интернализация и деградация рецептора ERBB2. Показано, что после присоединения к ERBB2 трастузумаба убиквитин-лигаза c-Cbl связывается с его внутриклеточной частью и убиквитинилирует её, что служит сигналом к деградации рецептора [Klarner и др., 2000]. Однако сам факт интернализации ERBB2 по-прежнему является предметом дискуссии.

Процесс лиганд-индуцированной интернализации достаточно подробно описан для других рецепторов семейства эпидермального фактора роста. Как правило, активированный лигандом рецептор димеризуется и затем подвергается рецептор-опосредованному эндоцитозу [Sorkin, Goh, 2009]. Комплекс рецептор-лиганд может после этого оказаться либо в ранней эндосоме, либо в мультивезикулярных тельцах. В обоих случаях рецептор впоследствии возвращается на клеточную мембрану, при этом время, необходимое для рециркуляции, определяется внутриклеточным траффикингом: путь из эндосомы займет более короткое время, чем из мультивезикулярных телец. Еще одним возможным вариантом является сортировка рецептора в лизосомы, где он подвергается расщеплению. В отношении интернализации самого рецептора ERBB2 существуют две диаметрально противоположных точки зрения: одни авторы утверждают, что ERBB2 вообще не способен к эндоцитозу [Haslekås и др., 2005; Hommelgaard, Lerdrup, Deurs, 2004], другие показывают, что ERBB2 интернализуется, но затем снова возвращается на плазматическую мембрану в ходе быстрой рециркуляции из ранней эндосомы [Austin и др., 2004; Harari, Yarden, 2000; Hendriks и др., 2003].

Интересно, что рецептор ERBB2, не имеющий своего уникального лиганда, не имеет и сигнала интернализации в составе внутриклеточного домена [Sorkin, Waters, 1993]. Ряд авторов приводит доказательства того, что в составе гетеродимеров ERBB2 способен ингибировать лиганд-активированную интернализацию других рецепторов семейства эпидермального фактора роста [Wang и др., 1999]. Считается, что гуманизованное моноклональное антитело трастузумаб (Herceptin) само по себе не способно приводить к интернализации ERBB2 [Longva и др., 2005]. Однако показано, что сочетанное использование трастузумаба с другим, неконкурентным антителом – пертузумабом (Perjeta) или с антителом L26, которое, как и пертузумаб, препятствует образованию гетеродимеров рецептора ERBB2 с другими членами семейства эпидермального фактора роста, приводит к эффективной интернализации рецептора и его деградации [Friedman и др., 2005; Nahta, Hung, Esteva, 2004].

Как видно из вышеперечисленного, сведения о способности ERBB2 к интернализации и вызывающих её условиях весьма противоречивы, однако работы нашей лаборатории, в том числе, данные настоящей диссертационной работы, убедительно свидетельствуют о реальности ухода ERBB2 с поверхности клетки в эндосомы [Proshkina и др., 2015; Шилова и др., 2015].

Помимо полноразмерных антител интернализацию рецептора ERBB2 могут запускать и другие искусственные лиганды. Для ERBB2-положительных клеток BT-474 было показано, что рекомбинантный белок 4D5scFv-дибарназа приводит к удалению рецептора с поверхности этих клеток при 37°C [Ivanova и др., 2012]. После интернализации ERBB2 обнаруживается в эндосомах и мультивезикулярных тельцах. В настоящей работе были получены данные,

подтверждающие факт интернализации и рециклизации рецептора ERBB2 в комплексе с лигандами на основе DARPIn 9-29. Данные, полученные нами при помощи конфокальной микроскопии и проточной цитометрии, подтвердили способность ERBB2 интернализироваться в комплексе с лигандом и позволили оценить время его рециркуляции.

Использование препаратов моноклональных антител трастузумаб и пертузумаб значительно увеличило эффективность терапии рака молочной железы. Трастузумаб стал первым ERBB2-специфичным терапевтическим моноклональным антителом, в 1996 году были получены результаты первых клинических исследований его эффективности: 11,6% пациентов с ERBB2-положительным метастатическим раком молочной железы достоверно ответили на терапию, препарат хорошо переносился и не вызывал образования нейтрализующих антител [Baselga и др., 1996]. Дальнейшие исследования подтвердили эффективность и низкую токсичность трастузумаба: препарат вызывал сравнимый или более значительный ответ по сравнению с химиотерапией, при этом вызывая менее тяжелые побочные эффекты [Baselga, 2001; Cobleigh и др., 1999; Vogel и др., 2001]. В среднем трастузумаб увеличивает продолжительность жизни пациентов на 5-8 месяцев, период без прогрессии опухоли увеличивается на 2-11 месяцев [Balduzzi и др., 2014]. Использование сразу двух таргетных препаратов, трастузумаба и пертузумаба, усилило эффект таргетной терапии: по результатам программы CLEOPATRA средняя продолжительность жизни пациентов, получавших трастузумаб и доцетаксел увеличилась с 40 до 56,5 месяцев при введении пертузумаба в схему лечения [Baselga, Swain, 2010; Swain и др., 2015]. В настоящее время трастузумаб и пертузумаб часто используются одновременно, и этот принцип был использован при создании биспецифического антитела ZW25, сочетающего паратопы обоих упомянутых моноклональных антител. В первой стадии клинических испытаний ZW25 вызвал достоверный ответ на терапию у пациентов с ERBB2-положительным раком молочной железы, гастроэзофагеальным раком и некоторыми другими типами опухолей [Meric-Bernstam и др., 2018].

По мере накопления данных секвенирования генома отдельных опухолей появлялось все больше свидетельств гиперэкспрессии ERBB2 в различных типах опухолей, включая колоректальный рак, рак желудка и гастроэзофагеальный рак, опухоли слюнных желез, влагалища, эндометрия, шейки матки, и мочевого пузыря. В связи с этим были расширены критерии отбора пациентов для клинических испытаний, а использование трастузумаба в комбинации с цисплатином и капецитабином или 5-фторурацилом было одобрено FDA для лечения пациентов с ERBB2-положительным раком желудка и пищевода [Meric-Bernstam и др., 2019]. Согласно результатам исследования MY PATHWAY достоверный ответ на терапию трастузумабом и пертузумабом показали пациенты с 9 типами ERBB2-положительных

опухолей, включая колоректальный рак (38% пациентов), рак мочевого пузыря (33%), рак желчного пузыря (29%), рак слюнной железы (80%), мелкоклеточный рак легкого (13%), рак поджелудочной железы (22%), рак яичника (13%), рак простаты и рак кожи (единичный пациент в каждом случае) [Hainsworth и др., 2018]. Отсюда можно заключить, что потенциал ERBB2-специфичной таргетной терапии не исчерпывается раком молочной железы и желудка, поэтому разработка новых таргетных препаратов, воздействующих на эту мишень, остается очень актуальной и востребованной.

Трастузумаб-эмтазин был разработан для того, чтобы усилить исходно низкую цитотоксичность антител и добиться сочетанного действия с химиотерапией. Этот препарат задействует те же механизмы, что и трастузумаб, но дополнительно угнетает жизнедеятельность раковых клеток за счет низкомолекулярного токсина - ингибитора сборки микротрубочек эмтазина, присоединенного к антителу стабильным линкером [Junttila и др., 2011]. В ходе испытаний по программе EMILIA терапия трастузумаб-эмтазином повысила среднюю продолжительность жизни больных с поздними стадиями рака молочной железы до 9,6 мес по сравнению с 6,4 мес при лечении капецитабином и лапатинибом [Verma и др., 2012]. Терапия трастузумаб-эмтазином увеличила среднюю продолжительность жизни и в случае пациентов с метастазами ERBB2-положительного рака в центральной нервной системе: этот показатель увеличился с 12,9 месяцев до 24,9 мес [Krop и др., 2015]. Программа TN3RESA также показала целесообразность терапии трастузумаб-эмтазином, которая увеличила медианную продолжительность жизни пациентов с раком молочной железы с 15,8 до 22,7 мес по сравнению с рутинной терапией [Krop и др., 2017].

Тем не менее, несмотря на успешное использование таргетных препаратов на основе антител, задача разработки таргетной ERBB2-специфичной терапии еще не может считаться решенной. У полноразмерных антител и препаратов на их основе есть свои недостатки: их сравнительно большой размер (150 кДа) может ограничивать проникновение препарата в солидные опухоли [Chauhan и др., 2011], к которым, как правило, относятся ERBB2-положительные новообразования. Кроме того, существующие терапевтические антитела не лишены побочных эффектов: для трастузумаба характерна выраженная кардиотоксичность [Riccio и др., 2016] и нарушения работы пищеварительной системы (тошнота, рвота, диарея) [Al-Dasooqi и др., 2009]. Пертузумаб, в свою очередь, вызывает диарею, кожную сыпь и нейтропению [Zhu и др., 2017].

Активность сигнальных путей, начинающихся с фосфорилирования ERBB2, может быть подавлена не только моноклональными антителами, присоединяющимися к внеклеточной части рецептора, но и низкомолекулярными ингибиторами киназ, лапатинибом и нератинибом. Было

показано, что лапатиниб увеличивает эффективность терапии ERBB2-положительного рака груди капецитабином: период без прогрессии заболевания увеличился с 4,4 до 8,4 мес [Geyer и др., 2006]. В ходе программы EGF104900 было также показано сочетанное действие лапатиниба с трастузумабом в отношении метастатического рака молочной железы [Blackwell и др., 2012]. Некоторые мутации ERBB2 делают его устойчивым к лапатинибу, однако рецептор остается чувствителен к нератинибу [Bose и др., 2013]. Эффективность нератиниба была также показана при подавлении роста рака молочной железы с мутировавшим, но не амплифицированным ERBB2 [Ma и др., 2017].

Из приведенных данных можно заключить, что таргетная ERBB2-направленная терапия действительно повышает эффективность лечения пациентов с ERBB2-зависимыми опухолями, однако полное излечение или продолжительность жизни пациентов более 5 лет по-прежнему являются редкими событиями, что стимулирует поиск новых препаратов.

### **1.1.2. Разработка таргетных препаратов на основе альтернативных скаффолдов**

Оценка уровня экспрессии ERBB2 на раковых клетках имеет важное значение при опухолевых заболеваниях, как для диагностики конкретного вида заболевания, так и для выбора схемы терапии [Ménard и др., 2000]. Таргетная терапия повышает эффективность стандартного лечения, и разработка таргетных ERBB2-специфичных препаратов активно продолжается. Одним из направлений этой работы является создание гибридных агентов, помимо адресного модуля содержащих токсичный компонент: комплекс с радионуклидом, белковый токсин или химиотерапевтический препарат. Основой таких многофункциональных агентов чаще всего являются моноклональные антитела или их фрагменты, однако и у антител есть свои недостатки: их сравнительно большой размер (150 кДа) может ограничивать проникновение как в нормальные ткани [Shah, Betts, 2013], так и в солидные опухоли [Chauhan и др., 2011], а константная часть помимо увеличения времени циркуляции в крови может вызывать и нежелательные эффекты [Simeon, Chen, 2018]. Кроме того полноразмерные антитела требуют сложного фолдинга и специфического гликозилирования, и потому должны нарабатываться в клетках млекопитающих, что сильно удорожает производство. Еще одной проблемой для получения моноклональных антител является гомология между мышинными и человеческими белками, что затрудняет отбор антител к консервативным белкам.

Многие из этих трудностей были решены получением укороченных и одноцепочечных вариантов антител. Развитие технологии получения рекомбинантных антител привело к тому,

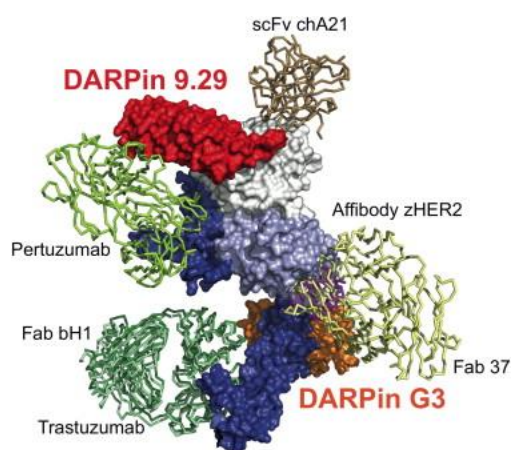
что классическая иммунизация была заменена полностью синтетическими библиотеками, не зависящими от ограничений на аутоспецифичность лимфоцитов. В дальнейшем разработанные при этом методы отбора молекул по аффинности к лиганду стали применяться для других белков и позволили обойтись без самих антител [Jost, Plückthun, 2014]. В последние 20 лет с помощью этих технологий было создано множество альтернативных каркасных белков, таких как монободы (получены из фибронектина III типа FN3), антикалины (получены из липокалинов), аффибоды (получены из иммуноглобулин-связывающего протеина А) и дарпины (получены из анкириновых повторов). Такие белки так же как и антитела, как правило, имеют «константную» каркасную часть и «вариабельные» участки, замены аминокислот в которых не приводят к изменению пространственной структуры белка [Plückthun, 2015]. Получение альтернативных каркасных белков состоит из двух стадий: 1) создание библиотеки белковых вариантов путем случайного или сайт-направленного мутагенеза и 2) отбор полученных молекул фаговым, дрожжевым или рибосомальным дисплеем, связывающим генотип (последовательность гена белка) и фенотип (способность связываться с мишенью).

К преимуществам альтернативных белков можно отнести их малый размер, облегчающий проникновение в опухоль, отсутствие константной части антител, позволяющее избежать цитотоксичности, опосредованной антителами и молекулами системы комплемента, во многих случаях высокую термостабильность, позволяющую долгое время хранить препарат при комнатной температуре без потери активности, легкость наработки в микроорганизмах и даже возможность прямого химического синтеза. Кроме того создавать и нарабатывать биспецифические молекулы из альтернативных белков гораздо проще, чем получать биспецифические антитела. Еще одним преимуществом таких молекул является независимость от иммунизации животных, что упрощает процедуру и расширяет спектр возможных молекул-мишеней за счет включения в него высококонсервативных белков [Simeon, Chen, 2018].

Дарпины (DARPin, **D**esigned **A**nkyrin **R**epeat **P**rotein), искусственные белки, созданные на основе анкириновых повторов, могут служить новым типом молекул, обеспечивающих блокировку рецептора и адресную доставку эффекторных компонентов терапии. Белки на основе повторяющихся мотивов активно используются, поскольку имеют протяженную связывающую поверхность, размер которой можно варьировать, и жесткую каркасную часть, сформированную «константными» участками [Grove, Cortajarena, Regan, 2008]. В эукариотической клетке белки, построенные из анкириновых повторов, связываются с самыми различными мишенями, обеспечивая организацию цитоскелета и регуляцию активности

ферментов [Stumpp, Binz, Amstutz, 2008]. Исходное разнообразие таких белков было использовано для создания консенсусного мотива, содержащего вариabельные участки и способного объединяться с соседними мотивами в единую жесткую структуру

В 2008 году Андреасом Плюктуном была опубликована работа, посвященная селекции дарпинов к различным молекулам, имеющим клиническое значение. Среди прочих белков в ней были описаны 4 разновидности DARPin, специфично узнающие опухолевый маркер ERBB2 [Steiner, Forrer, Plückthun, 2008], при этом эпитопы для связывания дарпинов отличаются от эпитопов для трастузумаба и пертузумаба (Рисунок 3). В нашей работе был использован вариант DARPin 9-29, отобранный для узнавания укороченной формы внеклеточного домена ERBB2, не содержащей домена IV. Этот белок массой 17 кДа, состоящий из пяти анкириновых повторов, связывается с первым субдоменом внеклеточной части ERBB2.



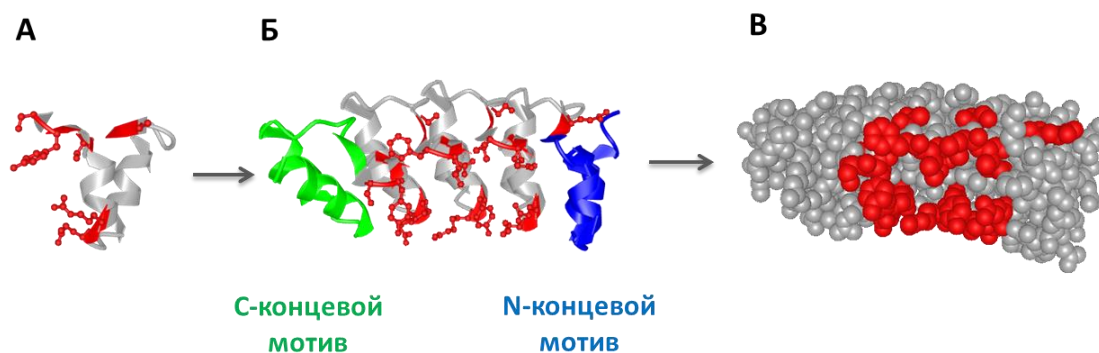
**Рисунок 3.** Модель взаимодействия терапевтических антител и других молекул с полноразмерным внеклеточным доменом рецептора ERBB2. Красным обозначен DARPin 9-29, темно-зеленым – трастузумаб, светло-зеленым – пертузумаб. По Jost *et al.*, 2013.

## 1.2. Использование особенностей строения дарпинов в исследованиях и биотехнологии

В качестве связывающих молекул дарпины могут применяться в большинстве методов, использующих укороченные варианты моноклональных антител. Однако помимо малого размера дарпины обладают и другими полезными свойствами. Легкость наработки в бактериях позволяет создавать белки слияния, добавлять последовательности для очистки и мечения, а отсутствие цистеинов позволяет ввести уникальный цистеин для точной конъюгации.

Дарпины состоят из плотно упакованных анкириновых повторов, каждый из которых образует  $\beta$ -поворот и две антипараллельные  $\alpha$ -спирали. Как правило, такой мотив состоит из 33 аминокислот, 6 из которых образуют связывающую поверхность (Рисунок 4А). При создании рекомбинантных библиотек в эти позиции помещаются кодоны случайных аминокислот за исключением цистеина (чтобы избежать образования дисульфидных связей), а также глицина и пролина (так как некоторые аминокислоты входят в состав  $\alpha$ -спирали) [Plückthun, 2015]. Далее эти самосовместимые мономеры случайным образом объединяются в молекулу, на N и C концы которой присоединяются модули, экранирующие гидрофобные участки мономеров (Рисунок 4Б), и полученные белки отбираются по аффинности и специфичности связывания с мишенью с помощью рибосомного или фагового дисплея [Forger и др., 2003].

Как правило, дарпины образованы 2-3 связывающими мотивами, заключенными между N- и C-концевыми мотивами. С точки зрения трехмерной структуры белка с анкириновыми повторами образуют правозакрученный соленоид, с протяженным гидрофобным кором и гидрофильной поверхностью, доступной растворителю [Kobe, Kajava, 2000]. По физико-химическим свойствам дарпины – маленькие белки (14-18 кДа), чрезвычайно термостабильные ( $T_m$ , температура плавления, может достигать  $90^\circ\text{C}$ ), устойчивые к протеазам и денатурирующим агентам. Они могут нарабатываться в бактериях с высоким выходом, до 200 мг белка с литра жидкой культуры [Plückthun, 2015].



**Рисунок 4.** Строение дарпинов. А – строение консенсусного анкиринового повтора, константная часть обозначена серым цветом, переменные участки – красным цветом. Б – строение молекулы дарпина. Два или три центральных мотива формируют связывающую поверхность за счет переменных аминокислот (обозначены красным цветом), гидрофобные участки экранированы С-концевым и N-концевым мотивами. В – пространственная структура дарпина, переменные аминокислоты выделены красным цветом.



Оба конца полипептидной цепи дарпинов формируют альфа-спирали, что облегчает создание геометрически точных мультимеров. Так, на основе двух дарпинов, узнающих разные, но перекрывающиеся эпитопы зеленого флуоресцентного белка при помощи компьютерного моделирования был создан молекулярный «зажим», обхватывающий молекулу GFP с образованием стабильного комплекса, тем не менее сохраняющего обратимость связывания. Такие зажимы были использованы для ориентированной посадки на чип для поверхностного плазмонного резонанса белков, слитых с GFP, и для хроматографической очистки таких белков на сефарозе, конъюгированной с данным дидарпином. Дидарпины, конъюгированные с флуоресцентным красителем, помогли усилить сигнал от редких GFP-меченных белков на поверхности клеток и позволили точнее детектировать их проточной цитометрией [Hansen и др., 2017].

При помощи компьютерного моделирования был создан дарпин, формирующий тример за счет добавленного к нему тримеризующего мотива, и связывающийся с тримерным белком аденовируса пятого серотипа Ad5. Этот белок подтвердил свою способность практически необратимо связываться с оболочкой аденовируса. При этом добавление еще одного дарпина, специфичного к рецептору клетки-мишени, позволило эффективно заражать клетки, экспрессирующие соответствующий онкомаркер (HER2, EGFR или EpCAM) [Dreier и др., 2013].

Жесткость и малый размер дарпинов позволили создавать димеры, влияющие на проведение сигнала от внеклеточных рецепторов за счет фиксации рецепторов в определенных конформациях или сближения молекул, генерирующих конкурирующие сигналы. Так, при помощи бивалентного дарпина удалось избирательно подавить активность тучных клеток, связавших иммунные комплексы на основе IgE. Один из модулей этого димера с высокой аффинностью узнает константную часть IgE, связавшуюся с FcεRI, другой связывается с низкоаффинным FcγRIIB, оказывающим ингибирующее действие на тучные клетки. Данный рекомбинантный белок специфически подавляет дегрануляцию тучных клеток *in vivo* [Zellweger и др., 2017]. Аналогичный подход был применен для создания биспецифического дидарпина, блокирующего проведение митогенного сигнала от рецептора HER2 и оказывающего цитотоксический эффект на HER2-положительные раковые клетки [Jost и др., 2013].

Помимо мультимеров с использованием гибких линкеров дарпины могут объединяться и в жесткие конструкции за счет введения альтернативных С- и N-концевых мотивов, имеющих общую альфа-спираль. Дарпины в таких ди- и тримерах по-прежнему могут одновременно

связывать свои мишени, стабилизируя их для кристаллизации [Wu и др., 2017]. Один из таких дарпинов, улучшавший кристаллизацию партнеров, был использован для создания жестких димеров с дарпинами, специфичными к JNK1, что позволило получить кристаллы этих комплексов и выявить структурные особенности, объясняющие специфичность дарпинов к изоформе киназы и их способность ингибировать ее активность [Wu и др., 2018]

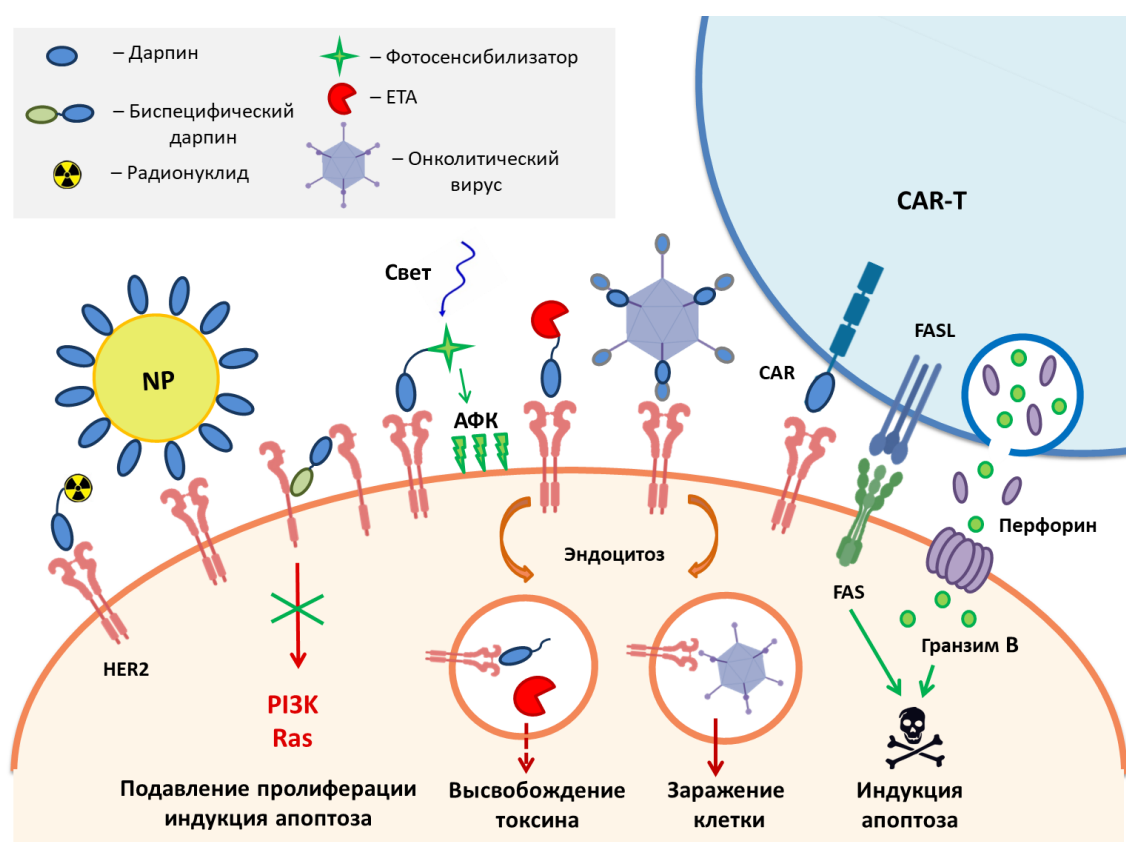
К недостаткам дарпинов как связывающих модулей можно отнести их вогнутую связывающую поверхность, жесткость и неполную рандомизацию переменных участков, что потенциально может ограничивать спектр возможных мишеней. Однако и эти ограничения могут быть преодолены: для этого были созданы дарпины нового поколения – LoopDARPin, в которых центральный  $\beta$ -поворот был заменен на более длинную выпуклую петлю H3 из молекулы иммуноглобулина. Такая вставка позволила изменить геометрию антигенсвязывающей поверхности, ввести гибкий участок с большим количеством переменных аминокислотных остатков и улучшить селективность связывания [Schilling, Schöppe, Plückthun, 2014].

Интересно отметить, что вогнутая связывающая поверхность дарпинов может служить и их преимуществом. Воспользоваться им позволяет еще одно свойство дарпинов – отсутствие цистеинов в белке, что позволяет ввести единственный цистеин в участок вблизи поверхности взаимодействия с мишенью и использовать его для конъюгации. В работе Kummer и коллег [Kummer и др., 2013] дарпин, специфичный к фосфорилированной форме ERK (pERK), был конъюгирован с мероцианиновым красителем, чувствительным к окружению – интенсивность его флуоресценции возрастает в гидрофобном окружении, т.е. тогда, когда дарпин связывается с pERK. Таким образом, был создан биосенсор, позволяющий детектировать фосфорилирование ERK. Поскольку было показано, что дарпин распознает не сам фосфат, а изменение конформации активационной петли [Kummer и др., 2012], этот подход может быть использован и для других белков, меняющих конформацию в ходе функционирования.

Таким образом, даже относительные недостатки дарпинов могут быть использованы для создания уникальных конструкций. В свою очередь преимущества дарпинов позволили найти множество применений этим белкам, в первую очередь, в терапии и диагностике онкологических заболеваний.

### 1.3. Применение дарпинов в качестве связывающих модулей

Принципы создания дарпинов были описаны в 2003 году [Forrer и др., 2003], а уже в 2007 году эта технология послужила для создания высокоаффинных белков, связывающихся с онкомаркером ERBB2 [Stumpp, Amstutz, 2007]. Впоследствии были получены дарпины, связывающиеся с другими молекулами, вовлеченными в канцерогенез: EpCAM [Winkler и др., 2009], EGFR [Steiner, Forrer, Plücker, 2008], VEGF [Binz и др., 2017], HGF [Binz и др., 2017], катепсином В [Kramer и др., 2017], KRAS [Bery и др., 2019] и другими, однако на сегодняшний день больше всего адресных агентов разработано на основе дарпинов, связывающихся с ERBB2. Основные способы применения дарпинов в разработке препаратов для диагностики и терапии рака суммированы на рисунке 5.



**Рисунок 5.** Применение дарпинов для визуализации и уничтожения раковых клеток. Дарпины могут ингибировать сигнальные молекулы клетки, подавляя пролиферацию клеток или служить направляющими модулями для доставки различных агентов: радионуклидов, наночастиц или липосом, фотосенсибилизаторов, белковых токсинов, онколитических вирусов и лимфоцитов с химерными антигенными рецепторами. HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2, NP – наночастица, АФК – активные формы кислорода, PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, Ras – малая GTP-аза Ras, CAR – химерный антигенный рецептор, CAR-T – Т-лимфоцит, несущий на поверхности химерный антигенный рецептор, FAS – рецептор смерти (CD95, APO-1) индуктор внешнего пути запуска апоптоза, FASL – лиганд рецептора FAS (CD95L, CD178), ETA – укороченный вариант экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*.

Визуализация опухоли важна для предклинических испытаний препаратов на животных, для установления диагноза пациенту и оценки эффективности терапии. В животных моделях для этого могут применяться флуоресцентные дальнекрасные белки, позволяющие осуществлять прижизненную визуализацию, такие как mCherry [Borovjagin и др., 2010]. На основе mCherry и ERBB2-специфичного DARPIn 9-29 был создан рекомбинантный белок DARPIn-mCherry, специфично окрашивающий ERBB2-положительные раковые клетки [Миронова и др., 2014] и использующийся для функционализации наночастиц [Deuev и др., 2017; Mironova и др., 2017; Proshkina и др., 2019], как будет описано ниже.

В случае визуализации опухоли в организме человека применяют радионуклиды, избирательно накапливающиеся в опухоли. Мономерные дарпины могут служить связывающими модулями для радиоиммунной диагностики, использующей высокоаффинный белок, конъюгированный с носителем радионуклида, как правило, хелатором или квазиковалентными комплексами технеция [Waibel и др., 1999]. Исходно эта технология была разработана для одноцепочечных антител, однако вскоре была применена и для других каркасных белков, так как основные требования, предъявляемые к связывающим модулям для радиоиммунной диагностики, включают высокую аффинность и малый размер [Schmidt, Wittrup, 2009; Zahnd и др., 2010]. Дарпины, сочетающие в себе оба этих свойства, могут успешно использоваться для радиоактивной визуализации опухолей. Так, на основе ERBB2-специфичных дарпинов G3 и 9-29 были получены конъюгаты с желаемой фармакокинетикой и пониженным накоплением в печени [Vorobyeva и др., 2018; Vorobyeva и др., 2019a; Vorobyeva и др., 2019b].

Что касается терапии рака, то дарпины могут служить как для доставки токсических модулей, так и для ингибирования сигнальных путей клетки за счет специфического связывания мембранных рецепторов. Биспецифический дидарпин с линкером определенной длины дал возможность зафиксировать внеклеточные части соседних рецепторов ERBB2 в нефункциональной конформации, не позволяющей образовывать димеры и проводить митогенный сигнал, что вызывало цитостатический и цитотоксический эффект для ERBB2-зависимых раковых клеток [Jost и др., 2013]. На основе данного димера был создан препарат MP0274, тетрадарпин, содержащий модули, распознающие домены I и IV рецептора ERBB2, и два модуля, связывающихся с человеческим сывороточным альбумином, которые увеличивают время циркуляции белка в крови. В 2017 году началась I стадия клинических испытаний этого препарата [Baird и др., 2018].

Клинические испытания проходит и еще один мультивалентный дарпин, MP0250. Этот белок содержит в одной полипептидной цепи модуль, специфичный к фактору роста эндотелия сосудов VEGF-A, модуль, специфичный к фактору роста гепатоцитов HGF, и два модуля, связывающиеся с сывороточным альбумином человека [Binz и др., 2017]. Таким образом, препарат ингибирует сразу два важных для раковых клеток сигнальных пути: VEGF/VEGFR и HFG/cMet, а связывание с альбумином позволяет добиться долгого времени циркуляции. MP0250 – первый мультимерный дарпин, который был протестирован на пациентах [Azaro и др., 2018], в ходе первой фазы клинических испытаний этот препарат хорошо переносился в дозах, достаточных для подавления активности VEGF. В 2018 году началась Ib/II стадия клинических испытаний MP0250 в сочетании с осимертинибом для лечения пациентов с неплоскоклеточным немелкоклеточным раком легкого (non-squamous non-small cell lung cancer, NSCLC) с мутировавшим EGFR [Kiemle-Kallee и др., 2018]. В 2017 году началась II стадия клинических испытаний MP0250 в сочетании с бортезомибом и дексаметазоном для лечения пациентов с резистентной и рецидивирующей множественной миеломой (refractory and relapsed multiple myeloma, RRMM), [Кноп и др., 2018].

Еще одним способом создания дарпинов с желаемой фармакокинетикой является конъюгация с полиэтиленгликолем и применение конъюгатов локально. Один из таких конъюгатов, специфичный к VEGF абиципар, применяется для лечения возрастной дегенерации сетчатки (neovascular age-related macular degeneration, ADE) и диабетического макулярного отека (diabetic macular edema, DME)[Smithwick, Stewart, 2017]. Этот препарат находится на третьей стадии клинических испытаний.

#### **1.4. Опухолеспецифические токсины на основе дарпинов**

Легкость наработки дарпинов в бактериальной системе экспрессии дала толчок к созданию противораковых агентов на основе белковых токсинов. Экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* (PE, ETA) является одним из наиболее эффективных индукторов апоптоза за счет собственной ферментативной активности, угнетающей трансляцию. PE состоит из трех доменов: домен I специфичен к рецептору  $\alpha$ -2-микроглобулина животных клеток (LRP1, CD369) рецептору животных клеток и обеспечивает интернализацию молекулы токсина в клетку; домен II содержит сайты протеолиза фурином и дисульфидные связи, восстанавливаемые протеин-дисульфидизомеразами, участвующими таким образом во внутриклеточном процессинге молекулы; домен III обладает собственно каталитической

активностью – АДФ-рибозилирует эукариотический eEF2, блокируя тем самым биосинтез белка в клетке, что в итоге приводит к ее гибели [Shapira, Benhar, 2010]. Доменное строение экзотоксина делает возможным использовать его укороченные варианты, сохраняющие каталитическую активность, заменяя при этом собственный связывающий домен на направляющие молекулы желаемой специфичности. При этом агенту достаточно проникнуть в эндосому, где эффекторный модуль отрезается эндосомальной протеазой, после чего токсин при помощи сигнала ретроградного транспорта KDEL транспортируется в эндоплазматический ретикулум, откуда высвобождается в цитозоль [Weldon, Pastan, 2011]. На сегодняшний день получено несколько противораковых адресных токсинов на основе ETA, которые показали высокий потенциал в качестве противоопухолевых агентов в доклинических испытаниях [Serna и др., 2018]. Несколько адресных токсинов на основе экзотоксина А находятся на первой стадии клинических испытаний [Hassan и др., 2014; Kreitman и др., 2012; Singh и др., 2012]. В том числе были созданы терапевтические агенты на основе ETA и дарпинов. Дарпин Ec4, специфичный к ErCAM, был использован для доставки укороченного варианта экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* к клеткам рака прямой кишки линии HT29. Полученный белок DARPIn-ETA показал противораковую активность как *in vitro*, так и *in vivo* [Martin-Killias и др., 2011].

Молекула ERBB2 также была использована в качестве мишени для дарпинов в виде белков слияния с псевдомонадным экзотоксином. Поскольку DARPIn 9-29 эффективно вызывает интернализацию ERBB2 в комплексе с присоединившимся белком [Шилова и др., 2015], этот адресный модуль хорошо подходит для доставки фрагментов экзотоксина к раковым клеткам. На основе модуля DARPIn 9-29 и фрагмента экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* массой 40 кДа был создан адресный токсин DARPIn-PE40, который успешно индуцировал апоптоз в ERBB2-гиперэкспрессирующих клетках, проявлял избирательную токсичность *in vitro* и эффективно подавлял рост клеток рака молочной железы в ксенографтной модели [Sokolova и др., 2016], что обсуждается в данной работе.

Одной из проблем противораковых агентов на основе псевдомонадного экзотоксина является их высокая иммуногенность. Будучи белком бактериального происхождения, ETA вызывает образование нейтрализующих антител, которые снижают эффективность терапии и повышают риск анафилактических реакций. Фактически это ограничивает область применения подобных агентов гематологическими злокачественными новообразованиями, сопровождающимися дисфункцией иммунной системы [Kreitman и др., 2012; Singh и др., 2012]. Для решения этой проблемы были разработаны различные подходы: использование

химиотерапии, подавляющей работу иммунной системы, мутагенез PE с последующей химической модификацией (ПЭГилированием), подавление иммунной системы пациента, выявление и элиминация путем мутагенеза иммунодоминантных эпитопов В- и Т-лимфоцитов. Последний из названных подходов наиболее универсален и совместим с разными схемами лечения опухолей [Mazor, King, Pastan, 2018]. В данной работе был использован один из вариантов С-концевого (эффекторного) фрагмента PE (LoPE), в составе которого были мутированы иммунодоминантные эпитопы В-лимфоцитов человека [Liu и др., 2012] для создания адресного токсина, специфичного к рецептору-онкомаркеру ERBB2, DARPin-LoPE [Прошкина и др., 2017]. DARPin-LoPE показал избирательную токсичность в отношении HER2-гиперэкспрессирующих клеток *in vitro* в пиколярном диапазоне концентраций [Прошкина и др., 2017] и эффективно подавлял рост клеток рака яичника в ксенографтной модели [Sokolova и др., 2019]. При этом неспецифическая токсичность и иммуногенность DARPin-LoPE была ниже, чем у DARPin-PE40, вклад дарпина в эти побочные эффекты был незначителен.

### 1.5. Применение дарпинов в адресной фотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия рака полагается на использование фотосенсибилизаторов, которые под действием света определенной длины волны заставляют кислород переходить в активные формы, основной из которых является синглетный кислород ( $^1O_2$ ) [Agostinis и др., 2012]. Преимуществом фотодинамической терапии по сравнению с химиотерапией является меньшее воздействие на нормальные ткани, поскольку освещению подвергается только определенная часть тела, однако и такая локализация воздействия не позволяет полностью избежать побочных эффектов, таких как сенсibilизация кожи и сетчатки глаза. Для решения этой проблемы применяются два подхода: увеличение селективности накопления фотосенсибилизатора в опухоли за счет физико-химических свойств самой молекулы и ковалентное присоединение адресных модулей к фотосенсибилизатору (таргетная фотодинамическая терапия) [Chilakamarthi, Giribabu, 2017]. Первыми адресными молекулами, использованными для специфической доставки фотосенсибилизатора в опухоль, стали моноклональные антитела. Этот подход получил развитие после работы Д. Мео и сотрудников, в которой авторы продемонстрировали возможность прямой конъюгации гематопорфирина с моноклональным антителом к антигену миосаркомы и показали преимущество полученного иммуноконъюгата *in vivo* по сравнению с обычным гематопорфирином [Mew и др., 1983]. Дальнейшее развитие адресной фотодинамической терапии привело к созданию конъюгатов, использующих и другие избирательно накапливающиеся в опухоли благодаря особенностям

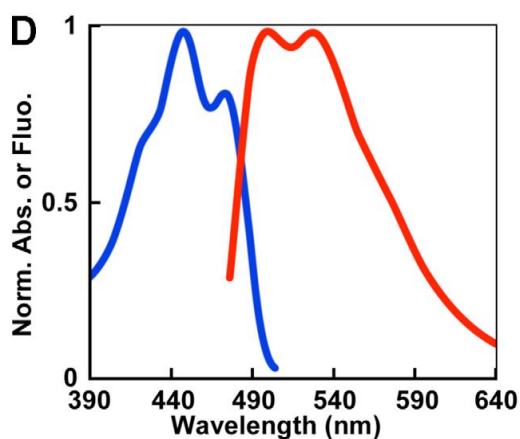
биохимии и сигнальных путей малигнизированных клеток модули. Так, для опухолей, зависящих в своем развитии от фолиевой кислоты, предложены к использованию конъюгаты фотосенсибилизаторов с фолиевой кислотой. Для опухолей, имеющих на поверхности клеток специфические интегрины и рецепторы гормонов, разрабатываются пептидные лиганды, также служащие средством доставки химических фотосенсибилизаторов [You и др., 2015].

Конъюгаты антител и фотосенсибилизаторов показывают хорошие результаты в специфическом устранении раковых клеток, несущих известные поверхностные маркеры в опытах *in vitro* и *in vivo* [Yoo, Ha, 2012]. Однако метод химической конъюгации фотосенсибилизаторов и антител имеет ряд недостатков: низкая воспроизводимость синтеза конъюгатов, агрегация, наличие в препарате примесей неконъюгированного фотосенсибилизатора, потеря аффинности антитела к рецептору и изменение физических свойств фотосенсибилизатора [Staneloudi и др., 2007].

Возможным решением этих проблем является создание генетически кодируемых гибридных молекул, постоянный состав и стабильно воспроизводимая функциональность которых определяются наработкой в виде единой молекулы. Создание таких фотосенсибилизаторов стало возможным с открытием фототоксичных белков, способных продуцировать активные формы кислорода при облучении светом определенной длины волны. На сегодняшний день известно два типа фототоксичных белков: производные GFP *Aequorea victoria* белки KillerRed [Bulina и др., 2006] и KillerOrange [Sarkisyan и др., 2015], и производные фототропина *Arabidopsis thaliana* белки miniSOG [Shu и др., 2011] и miniSOG2 [Makhijani и др., 2017].

Дарпин 9-29 был использован для доставки к раковым клеткам фототоксичного белка miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator). Этот белок был получен на основе последовательности LOV2 (Light Oxygen Voltage) домена фототропина 2 (*AtPhot2*) путем сайт-специфического мутагенеза. LOV домен в качестве кофактора содержит флавиновый моноклеотид (FMN), который возбуждается под действием синего света, после чего энергия возбужденного состояния расходуется на образование ковалентной связи с консервативным цистеином-426. Замена C426G вступающего в эту реакцию цистеина на глицин привела к изменению активности белка: в ответ на облучение синим светом, вся энергия возбужденного состояния FMN расходуется на образование синглетного кислорода. После дополнительного мутагенеза был отобран вариант с квантовым выходом синглетного кислорода  $0,47 \pm 0,05$ . Спектр поглощения miniSOG имеет два пика, соответствующих 448 и 473 нм, максимумы спектра флуоресценции приходятся на 500 и 528 нм, см. рисунок 6 [Shu и др., 2011].





**Рисунок 6.** Спектры поглощения (синий) и эмиссии (красный) белка miniSOG. По Shu et al., 2011.

Исходно белок miniSOG был разработан как генетически кодируемый маркер для электронной микроскопии: miniSOG генерирует синглетный кислород в количествах, достаточных для инициации процесса окислительной полимеризации диаминобензидина (DAB). Полимер, получаемый при окислении DAB, взаимодействует с тетраоксидом осмия, и продукт этой реакции выступает в качестве метки для электронной микроскопии. Однако существует возможность использования miniSOG в качестве токсического модуля для исследования онтогенеза, избирательной инактивации белков и применения в фотодинамической терапии [Lin и др., 2013; Ryumina и др., 2013; Souslova, Mironova, Deyev, 2017].

На основе одноцепочечного ERBB2-специфичного антитела и фототоксичного белка miniSOG был создан генетически кодируемый адресный фотосенсибилизатор 4D5scFv-miniSOG, который при облучении синим светом селективно уничтожает клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 при облучении. Показано, что в отношении этих раковых клеток 4D5scFv-miniSOG проявляет цитотоксический эффект в 8 раз превосходящий таковой для химического конъюгата порфирина с таким же адресным доменом [Mironova и др., 2013]. Однако сверхпродукция 4D5scFv-miniSOG в бактериях приводит к тому, что основная часть целевого белка находится в тельцах включения, и его ренатурация идет неэффективно. Замена адресного модуля на ERBB2-специфичный DARPIn 9-29 помогла решить проблему наработки целевого белка в бактериях в растворимом виде и добиться выхода 15 мг с литра жидкой культуры. DARPIn-miniSOG показал избирательную токсичность в отношении HER2-гиперэкспрессирующих клеток аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 *in vitro* [Proshkina и др., 2015].

Дарпины могут также использоваться для доставки фототоксичных наночастиц, позволяя создавать многофункциональные противораковые агенты, что мы обсудим далее.

### 1.6. Применение дарпинов для доставки наночастиц

Наноструктуры находят все более широкое применение в фундаментальных исследованиях, диагностике и терапии различных заболеваний. Некоторые виды наночастиц исходно обладают уникальными характеристиками, позволяющими использовать их для эффективного контрастирования патогенных очагов с помощью рентгеновского, инфракрасного и других видов электромагнитных излучений. Больше всего разработок ведется в области противораковых наночастиц, в первую очередь из-за того, что несовершенная васкуляризация и дезорганизация клеточных контактов опухоли позволяет многим типам наночастиц проникать в опухоли более эффективно, чем в нормальные ткани [Greish, 2010; Shilova и др., 2018]. Преимуществом наночастиц перед низкомолекулярными и белковыми препаратами является возможность объединять в одном агенте несколько функций, в том числе нацеливать частицу на раковые клетки при помощи поверхностных модификаций. Часто для этой цели используют моноклональные антитела, однако для полноразмерных антител по-прежнему остаются актуальными проблемы их правильной ориентации и стандартизации числа антител на одной частице [Nazarenus и др., 2014]. Помимо антител и их фрагментов для доставки наночастиц могут использоваться альтернативные скаффолды, белки, специфично поглощающиеся опухолью, такие как факторы роста и трансферрин, аптамеры и низкомолекулярные вещества, например фолиевая кислота [56, 57].

Как и моноклональные антитела, дарпины могут использоваться для функционализации наночастиц. DARPin 9-29 был использован для доставки в опухоль апконвертирующих наночастиц для фотодинамической терапии. Частицы состава  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}_3^+\text{Tm}_3^+/\text{NaYF}_4$ , испускающие ультрафиолет под действием инфракрасного излучения, были покрыты белком DARPin-mCherry [Миронова и др., 2014], позволяющим визуализировать опухолевые клетки за счет флуоресцентно дальнекрасного модуля mCherry [Mironova и др., 2017]. DARPin 9-29 и содержащий его DARPin-mCherry были также использованы для покрытия золотых наночастиц диаметром 5 нм [Deuev и др., 2017] и золотых наностержней [Proshkina и др., 2019]. Дарпин эффективно связывался с поверхностью частицы, формируя оболочку в среднем из 35 молекул белка, уменьшая склонность частиц к агрегации. При этом присоединение дарпина к частице оставляло свободным его участок взаимодействия с ERBB2, что обеспечивало избирательное

связывание полученных наночастиц с ERBB2-гиперэкспрессирующими клетками [Deyev и др., 2017].

Дарпины и белки на их основе успешно присоединяются к наночастицам при помощи карбодиимидной конъюгации. DARPin 9-29 был ковалентно присоединен к апконвертирующим радиоактивным наночастицам, покрытым сополимером малеинового ангидрида с 1-октадецином (РМАО). Полученные наночастицы были использованы для визуализации опухоли молочной железы в ксенографтной мышинной модели и показали низкую побочную токсичность *in vivo* [Guryev и др., 2019], тот же способ конъюгации был применен для функционализации апконвертирующих наночастиц белком DARPin-mCherry в работе, упомянутой [Mironova и др., 2017]. DARPin-PE40 был аналогично присоединен к апконвертирующим радиоактивным наночастицам, полученные наночастицы позволили визуализировать опухоли *in vivo* и эффективно уничтожали HER2-гиперэкспрессирующие клетки как *in vitro*, так и *in vivo* [Guryev и др., 2018]. За счет введения уникального остатка цистеина HER2-специфичный дарпин G3 удалось конъюгировать с флуоресцеин-малеимидом, а затем соединить меченый дарпин с суперпарамагнитными наночастицами, покрытыми полимолочной кислотой, путем активации ее С-концевых карбоксильных групп карбодиимидом [Li и др., 2017]. Дарпин был присоединен к наноструктурам и при помощи малеимидной конъюгации: таким образом дарпин 9-29 был соединен с ЕТА-содержащими липосомами, функционализированными по поверхности реактивом Траута [Deyev и др., 2018a].

Таким образом, стандартные методики присоединения иммуноглобулинов к наночастицам применимы и к дарпинам, однако последние могут включаться в наноструктуры и за счет включения в белки слияния, взаимодействующие с поверхностью частицы. Такой подход позволяет не только добиться желаемой ориентации связывающего модуля, но и собирать нацеливающие модули по принципу конструктора. Так, белок DARPin-Bn, состоящий из DARPin 9-29, гибкого линкера и рибонуклеазы барназы был использован для создания адресных кремниевых наночастиц. Наночастицы были покрыты белком барстар, содержащим кремний-связывающий пептид (SBP-Bs), обеспечивающий прикрепление SBP-Bs к частице. Поскольку барназа и барстар связываются друг с другом с очень высокой аффинностью ( $K_a = 10^{14} \text{ M}^{-1}$ ), их использование позволяло собрать функциональный слой наночастиц в растворе без применения конъюгации или реализовать стратегию претаргетинга, доставляя к клеткам адресный белок, к которому впоследствии присоединялась наночастица [Shipunova и др., 2018]. Слияние барназы с пептидом, связывающимся с поверхностью магнетита, позволило

использовать тот же белок DARPin-Vn для функционализации наночастиц из магнетита и их доставки к раковым клеткам [Shipunova и др., 2019].

Таким образом, дарпины могут использоваться для создания адресных наночастиц наравне с антителами и их фрагментами. Более того, их малый размер и простота наработки в бактериях, в том числе в виде белков слияния, дают уникальные возможности для сохранения аффинности и специфичности связывания за счет благоприятной ориентации молекулы.

### **1.7. Применение дарпинов для создания онколитических вирусов**

Молекулы, полученные из вирусов и бактерий, широко используются для создания противораковых агентов [Shilova и др., 2018], но для разрушения опухолевых клеток можно использовать и целые репликативно активные вирусы [Russell, Peng, Bell, 2012]. Онколитические вирусы – новый, очень своеобразный класс терапевтических препаратов, во многом действующих в организме пациента самостоятельно. Некоторые вирусы проявляют природную тропность к опухолевым клеткам, но чаще для создания онколитических агентов используются вирусы, поддающиеся перенацеливанию путем модификации поверхностных белков, такие как вирус кори, аденовирус, вирус везикулярного стоматита, вирус коровьей оспы и вирус простого герпеса [Russell, Peng, Bell, 2012]. Можно изменить природную специфичность вируса за счет адаптерных биспецифических белков, как это было успешно проделано для аденовирусов при помощи тримеризующихся дарпинов [Dreier и др., 2013], однако чаще применяется слияние нацеливающих модулей с белками оболочки, поскольку в этом случае все свойства вируса оказываются закодированы в его геноме. Дарпины, как и одноцепочечные антитела, могут использоваться для такого изменения специфичности, причем их малый размер позволяет успешно встраивать кодирующие их последовательности в вирусные векторы.

Белок оболочки вируса кори был модифицирован дарпинами, специфичными к ERBB2, EGFR или EpCAM. Полученные вирусные частицы теряли тропность вируса к естественным рецепторам и избирательно заражали клетки, избыточно экспрессирующие соответствующий опухолевый маркер. Вирусные частицы, несущие на поверхности дарпин, специфичный к ERBB2, вызывали лизис клеток эффективнее, чем вирус, функционализированный ERBB2-специфичным одноцепочечным антителом. Использование двух соединенных линкером дарпинов, узнающих ERBB2 и EpCAM, позволило создать биспецифические вирусные

частицы, сохранившие высокую цитолитическую активность, характерную для моноспецифичных вирионов [Friedrich и др., 2013; Hanauer и др., 2016].

Для заражения ERBB2-положительных опухолевых клеток был также использован аденоассоциированный вирус, покрытый модифицированным белком оболочки VP2, слитым с дарпином. Полученные вирионы специфически заражали ERBB2-положительные клетки и доставляли векторы с генами люциферазы либо тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-ТК) к клеткам SK-OV-3 *in vivo*. Вирусные частицы, содержащие генотерапевтический вектор, кодирующий HSV-ТК, в сочетании с ганциклавиром эффективно подавляли рост ксенографтной опухоли, не вызывая гепатотоксичности [Münch и др., 2013]. Аналогичные вирусные частицы были созданы с использованием EGFR-специфичных дарпина и аффибоди, и оба препарата показали избирательную токсичность в отношении EGFR-положительных клеток *in vitro* [Hagen и др., 2014].

### **1.8. Применение дарпинов для создания химерных антигенных рецепторов**

Накопление знаний о функционировании иммунной системы позволило создать технологию адресной терапии рака, использующей цитотоксические лимфоциты – Т-лимфоциты и NK-клетки. Для этого лимфоциты трансдуцируются конструкциями, кодирующими химерный антигенный рецептор (Chimeric Antigen Receptor, CAR), специфичный к опухолевому антигену и имеющий все необходимые для активации клетки домены, включая сигнальные последовательности костимулирующих молекул обычного рецептора [Wilkins, Keeler, Flotte, 2017]. При активации через химерные рецепторы лимфоциты секретируют провоспалительные цитокины и запускают апоптоз в клетке-мишени через рецептор FAS, инициирующий внешний путь активации апоптоза, а также с помощью гранзимов, напрямую активирующих эффекторные каспазы и каспазозависимые пути клеточной гибели [Benmebarek и др., 2019]. Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-T) успешно борются с гематологическими опухолями, устойчивыми к химиотерапии, позволяя добиться полного излечения у большого числа пациентов [Kochenderfer и др., 2015; Maude и др., 2014]. Большинство разработанных на сегодняшний день химерных рецепторов содержат в качестве антигенраспознающего домена одноцепочечный вариант антитела, однако дарпины также могут определять специфичность CAR. Более того, дарпины имеют некоторые преимущества перед одноцепочечными антителами: они компактнее, а значит, кодирующие их последовательности занимают меньше места в вирусном векторе для трансдукции лимфоцитов;

дарпины более термодинамически стабильны; и наконец, дарпины мономерны в отличие от антител, чья связывающая поверхность разделена между  $V_L$  и  $V_H$ , а значит, дарпины могут использоваться для создания мультиспецифичных CAR [Hammill и др., 2015].

CAR-T с рецептором на основе ERBB2-специфичного дарпина G3 показали такой же уровень активации, что и клетки с химерным рецептором, содержащим одноцепочечное антитело FRP5. При этом дарпин-содержащие CAR-T показали высокую токсичность в отношении ERBB2-положительных раковых клеток и низкую – в отношении контрольных клеток, не экспрессирующих ERBB2 [Hammill и др., 2015]. Сходные результаты были получены при сравнении CAR-T терапии на основе антитела 4D5 и дарпинов G3 и 9-29. Все исследованные типы клеток специфически узнавали ERBB2 и показали высокую цитотоксичность в отношении ERBB2-положительных клеток *in vitro*, наибольшую активность проявили клетки с рецепторами на основе дарпина G3. В ксенографтной модели рака яичника различия между CAR-T на основе разных дарпинов проявились ярче: клетки с рецепторами на основе 4D5scFv и дарпина G3 лучше инфильтрировали опухоль и эффективнее подавляли ее рост [Sieglar и др., 2017]. В целом можно заключить, что CAR-T на основе дарпинов не уступают Т-лимфоцитам с искусственными рецепторами, содержащими одноцепочечные антитела, а сравнительная простота получения дарпинов и их мономерность облегчают создание химерных рецепторов к разным мишеням.

Естественные киллеры также могут служить агентами для распознавания опухолевых клеток при помощи химерных антигенных рецепторов. Их цитотоксичность основана на тех же механизмах, что и активность  $CD8^+$  Т-клеток, а природный путь активации дает CAR-NK некоторые преимущества перед CAR-T. NK-клетки не распознают пептид в комплексе с МНС I [Farag, Caligiuri, 2006], что снижает риск запуска реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Это свойство уже используется для терапии рака переливанием донорских NK-клеток [Miller и др., 2005; Rubnitz и др., 2010; Yoon и др., 2010] или даже клеток стабильной линии NK-92 [Arai и др., 2008; Tonn и др., 2013], что увеличивает эффективность терапии даже без экспрессии клетками химерных рецепторов. Таким образом можно создавать препараты на основе стабильных клеточных линий NK-клеток, не получая клетки из пациента [Rezvani и др., 2017]. Дополнительными преимуществами NK-клеток являются наличие собственных механизмов распознавания перерожденных клеток, которые позволяют им оставаться эффективными противораковыми агентами даже при утрате или мутации химерных антигенных рецепторов. На сегодняшний день не создано противораковых CAR-NK с участием дарпинов, однако развитие этого перспективного направления, скорее всего, не заставит себя долго ждать.

## 1.9. Заключение

Дарпины были разработаны как альтернативные каркасные белки, и они действительно смогли стать альтернативой антителам: дарпины отличаются по методу получения, физико-химическим характеристикам, способу наработки, и при этом находят себе применение в большинстве технологий, использующих антитела. Исключением являются методики и терапевтические подходы, использующие свойства константной части молекул иммуноглобулинов. Преимущества дарпинов, такие как малый размер, независимость от иммунизации животных и легкость получения белков слияния делают их перспективными инструментами для исследований и эффективными компонентами терапевтических и тераностических агентов. На данный момент трудно предположить, что альтернативные каркасные белки полностью заменят антитела, однако они дополняют спектр используемых адресных белков, расширяя спектр мишеней за счет другого строения паратопа и предоставляя исключительные возможности для создания биспецифических и мультивалентных конструкций.

В данной работе указанные преимущества дарпинов позволили создать рекомбинантные бифункциональные белки, позволяющие визуализировать опухолевые клетки либо избирательно их уничтожать.

## ГЛАВА II. Материалы и методы

### 2.1. Нарботка и выделение рекомбинантных белков

Для наработки белков в работе использовали генетические конструкции на основе плазмиды pET-22b, полученные в лаборатории молекулярной иммунологии. Гены рекомбинантных белков поставлены под контроль T7 индуцибельного промотора, в качестве селективного маркера использовали ген устойчивости к ампициллину *bla*, исходно входящий в состав плазмиды pET-22b. Последовательность ДНК, кодирующая адресный полипептид DARPin 9-29, использованный во всех описанных в работе белках, амплифицировали с матрицы плазмиды pCG-Hnse-DARPin-d18-9-29 (предоставлена А. Плюктуном, Университет Цюриха). Последовательность, кодирующая дальнекрасный флуоресцентный белок mCherry и линкер PKPSTPPGSS из шарнирной области IgG мыши, амплифицировали с плазмиды pIG6-4D5scFv-mCherry [Миронова и др., 2014]. Полученная генетическая конструкция содержала в одной рамке считывания последовательности, кодирующие DARPin 9-29, гибкий линкер и mCherry, а также гексагистидиновую метку в 3'-концевой части экспрессионной кассеты. Остальные конструкции, использованные в работе, соответствовали данной схеме (адресный модуль DARPin 9-29, гибкий линкер, эффекторный белок и гексагистидиновая последовательность для аффинной очистки). Последовательность, кодирующая фототоксин miniSOG и линкер из 16 аминокислот EFPKPSTPPGSSGGAP, амплифицировали с плазмиды pSD-4D5scFv-miniSOG (Mironova *et al.*, 2014, Proshkina *et al.* 2015). Последовательность, кодирующая фрагмент экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* массой 40 кДа, амплифицировали с плазмиды pSD-4D5scFv-ETA [Sokolova и др., 2016; Sokolova и др., 2015], последовательность гена экзотоксина LoPE с мутированными или удаленными иммунодоминантными эпитопами была синтезирована фирмой «Biomatik» (США) [Liu и др., 2012; Прошкина и др., 2017].

#### 2.1.1. Получение бактериальных компетентных клеток

В 50 мл жидкой среды SOB (2% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>) заседали 0,25 мл ночной культуры клеток *E. coli* и инкубировали при 30°C с аэрацией до оптической плотности A<sub>600</sub> 0,4. Биомассу охлаждали во льду 10 мин, после чего центрифугировали 5 мин при 2500 g (4°C). Осадок ресуспендировали в 15 мл охлажденного во льду раствора TB (10 мМ HEPES, 15 мМ CaCl<sub>2</sub>, 250 мМ KCl, 55 мМ MnCl<sub>2</sub>), инкубировали 10 мин на льду, вновь центрифугировали при том же режиме,



надосадочную жидкость удаляли, ресуспендировали осадок в 7 мл ТВ, через 10 мин вновь центрифугировали. Клетки ресуспендировали в 2 мл охлажденного во льду ТВ, содержащего 150 мкл DMSO, суспензию расфасовывали в пробирки по 0,2 мл и хранили при -70°C [Inoue, Nojima, Okayama, 1990].

### 2.1.2. Трансформация компетентных клеток

Для трансформации компетентных клеток методом теплового шока 200 мкл замороженной суспензии компетентных клеток размораживали на льду и добавляли 10 - 20 нг плазмидной ДНК. Инкубировали во льду 30 мин, выдерживали 50 с при 42°C и добавляли 800 мкл среды SOC (2% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 20 мМ глюкоза). После этого суспензию клеток инкубировали в течение 1 ч при 37°C и рассеивали по 100-200 мкл на чашки с LB-агаром (1% триптон, 1% NaCl, 0,5% дрожжевого экстракта, 30 г/л агара, 100 мкг/мл ампициллина). Чашки инкубировали в течение ночи при 37° С. Эффективность трансформации составляла ~10<sup>6</sup> трансформантов на 1 мкг ДНК.

### 2.1.3. Экспрессия целевых белков в бактериальной системе

Для каждого из белков подбирали оптимальные условия культивирования штамма-продуцента и индукции белка, а также оптимальную методику выделения. Для наработки биомассы, содержащей целевой белок, использовали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3). После трансформации клеток плазмидной ДНК единичную колонию с чашки засеивали в жидкую среду LB с ампициллином и выращивали в течение ночи при температуре 37° С с аэрацией. После этого 1/50 часть ночной культуры клеток переносили в 400 мл жидкой среды LB с антибиотиком и растили при 25° С с аэрацией до оптической плотности OD<sub>600</sub> 0,5-0,6. Синтез целевого белка индуцировали, добавляя к культуре бактерий изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 1 мМ. После добавления индуктора бактериальную биомассу культивировали при температуре 25°С (с тем, чтобы минимизировать долю агрегировавшего целевого белка) в течение 6-8 ч.

#### 2.1.4. Хроматографическая очистка белков

Поскольку все исследованные в работе белки содержали гексагистидиновую последовательность, очистку проводили при помощи металло-хелатной хроматографии. При необходимости проводили дальнейшую очистку ионообменной хроматографией. После завершения индукции клетки осаждали центрифугированием при 4°C и 2600g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в буфере для лизиса Т3 (5 mM Tris, 40 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 8.3), клетки разрушали при помощи ультразвукового дезинтегратора. Дебрис удаляли центрифугированием при 11000g в течение 30 мин. Супернатант пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, pH лизата доводили до значения 8,3 и наносили на уравновешенную буфером Т3 колонку Ni<sup>2+</sup>-NTA (GE Healthcare, США). Белки, не связавшиеся с сорбентом, удаляли промыванием колонки буфером Т3, элюцию проводили ступенчато возрастающей концентрацией имидазола в элюирующем буфере при помощи перистальтического насоса.

Для белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE вместо буфера Т3 использовали 20 mM фосфатно-солевой буфер (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 7,5) с добавлением 30 mM имидазола. Для дальнейшей очистки использовали фракции, соответствующие пикам элюции, зарегистрированным при промывании колонки раствором 250 mM имидазола в случае DARPin-LoPE40 и 500 mM имидазола в случае DARPin-PE40. Для этого белки переводили в буфер: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0 при помощи гель-фильтрационной колонки с сефадексом G-25 PD-1 (GE Healthcare, США). Затем растворы разбавляли в 3 раза до 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 и наносили на колонки для анионообменной хроматографии MonoQ5/50 GL (GE Healthcare), заранее уравновешенные 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Элюцию белков проводили ступенчатым градиентом NaCl (100 mM, 250 mM, 500 mM), фракции белка, полученные при элюции 500 mM NaCl, использовали для дальнейшей очистки.

Очистку от липополисахаридов проводили на полимиксине В при помощи колонок Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (Thermo Scientific, США), предварительно уравновешенных соответствующим буфером, по протоколу производителя.

#### 2.1.5. Электрофорез полученных фракций белка в денатурирующем ПААГ и визуализация

Полученные фракции белков анализировали при помощи электрофореза в двухступенчатом денатурирующем полиакриламидном геле [Laemmli U.K., 1970]. Верхний

(концентрирующий, 4%) - готовили в 1x буфере UB (4X UB имеет состав: 0,5 М трис-НСl, рН 6,8, 0,4% SDS), нижний (разделяющий, 12%) –в 1x буфере DB (4X DB имеет состав: 1,5 М трис-НСl, 0,4 % SDS; рН 8,8). Электрофорез проводили при напряжении 200 В в трис-глициновом буфере до тех пор, пока краситель бромфеноловый синий не достигал конца геля.

После электрофореза гель помещали на 5-10 мин в фиксирующий раствор (10% трихлоруксусная кислота, 10% изопропанол), затем в течение 30-60 мин прокрашивали раствором красителя Кумасси R-250 (0,2% Кумасси R-250, 10% ледяной уксусной кислоты, 10% изопропанола). Гель отмывали 5% уксусной кислотой.

Концентрацию белка в полученных фракциях определяли микробиуретовой реакцией в присутствии бигинхониновой кислоты при помощи набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, США) по протоколу производителя. Поглощение проб измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре Infinite M1000 PRO (Tecan, Швейцария).

## **2.2. Определение специфичности связывания рекомбинантных белков на основе DARPin 9-29 с ERBB2-положительными опухолевыми клетками методом проточной цитофлуориметрии**

Специфичность связывания DARPin 9-29 и рекомбинантных белков на его основе с ERBB2 проверяли на клеточных линиях, экспрессирующих на своей поверхности разные количества данного рецептора (SK-BR-3 содержат  $1 \times 10^6$  молекул на клетку, BT-474 –  $1 \times 10^6$  молекул на клетку, HeLa –  $10^4$  молекул на клетку, CHO – не имеют ERBB2 на своей поверхности) [Сао и др., 2014; Sarup и др., 1991]. DARPin 9-29 для этого конъюгировали с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), как описано ниже в разделе 2.2.1; в случае белков DARPin-mCherry и DARPin-miniSOG использовали их собственные флуоресцентные свойства. Для предотвращения проявления цитотоксического эффекта все процедуры, предшествующие измерению флуоресценции клеток, окрашенных DARPin-miniSOG, проводили при минимальном освещении. Измерения проводили при помощи приборов BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США) и NovoCyte (Acas, США), полученные данные обрабатывали при помощи программ BD Accuri C6 Software и Novo Express.

### **2.2.1. Конъюгация белка DARPin 9-29 с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC)**

Для получения флуоресцентно меченного дарпина (DARPin-FITC) DARPin 9-29, выделенный по методу, описанному в п. 2.1, переводили в 20 мМ фосфатно-солевой буфер pH 8 на колонке Zeba Spin Desalting Column с массой отсечения 7 кДа (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя и инкубировали с FITC в мольном соотношении 1:1 в течение ночи при 4 °С, конъюгат очищали от несвязавшегося FITC на колонке Zeba Spin Desalting Column.

### **2.2.2. Взаимодействие белков с поверхностью клеток**

Опухолевые клетки с различным содержанием ERBB2 на цитоплазматической мембране снимали с культурального пластика стерильным раствором Версена, подсчитывали плотность при помощи прибора Contessa (Invitrogen, США) по протоколу производителя, брали по  $10^5$  клеток на пробу. Клетки промывали холодным стерильным раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) и инкубировали 10 мин на льду в растворе белка в PBS с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина для блокировки неспецифических взаимодействий (PBS-BSA). Затем клетки дважды отмывали от несвязавшегося белка холодным PBS-BSA и за 5 мин до измерения добавляли к суспензии раствор иодида пропидия до конечной концентрации 2,5 мкг/мл для исключения из анализа мертвых клеток с поврежденной плазматической мембраной. Флуоресценцию возбуждали синим лазером с длиной волны 488 нм и мощностью 20 мВт, для детекции использовали фильтры 533/30 нм (FL1 канал) для сигнала DARPin-miniSOG и DARPin-FITC и 585/40 нм (FL2 канал) для флуоресценции иодистого пропидия, интеркалировавшего в ДНК. В качестве контрольных использовали неокрашенные белком клетки соответствующих линий. Полученные данные анализировали с использованием программ BD Accuri C6 Software и FlowJo. Клетки отделяли от дэбриса по прямому и боковому светорассеянию (SSC-A/FSC-A), среди клеток для анализа выбирали единичные события (синглеты) по прямому светорассеянию (FSC-H/FSC-A). Окрашивание клеток оценивали по изменению среднего уровня флуоресценции популяции клеток в канале FL-1 (Mean FL-1A) по сравнению с неокрашенными клетками.

В случае белка DARPin-mCherry измерения проводили на проточном цитометре Novo Cyte (Асеа, США), флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 561 нм, детектировали в канале 615/20 нм. Популяцию живых клеток выделяли по прямому и боковому

светорассеянию (SSC-A/FSC-A), среди них единичные события выделяли по прямому светорассеянию (FSC-H/FSC-A). Полученные данные анализировали с использованием программ NovoExpress и FlowJo.

### **2.2.3. Взаимодействие белка DARP-miniSOG с клетками SK-BR-3 в присутствии конкурирующего полипептида DARPIn 9-29**

Токсический модуль miniSOG обладает флуоресцентными свойствами, однако квантовый выход флуоресценции сравнительно мал, поэтому изменение флуоресценции окрашенных им клеток невелико. Для валидации полученного сигнала проводили тест на способность DARPIn-miniSOG связываться с рецептором ERBB2 в присутствии конкурирующего лиганда DARPIn 9-29. Для этого клетки линии SK-BR-3 инкубировали с белком DARPIn-miniSOG в концентрации 500 нМ так, как было описано в предыдущем разделе, параллельно другую пробу клеток инкубировали со смесью белков DARPIn-miniSOG и DARPIn 9-29 в эквимольном соотношении (по 500 нМ каждого белка), и третью – со смесью белков DARPIn-miniSOG и 4D5scFv в тех же соотношениях. Белок DARPIn 9-29 в данном случае служил конкурирующим агентом, одноцепочечное антитело 4D5scFv использовали в качестве отрицательного контроля, так как это антитело специфично к IV внеклеточному домену ERBB2, в то время как модуль DARPIn 9-29 связывается с I доменом этого рецептора.

### **2.3. Определение специфической цитотоксичности адресных токсинов на основе DARPIn 9-29**

Цитотоксичность адресных белков определяли с помощью МТТ-теста [Mosmann, 1983]. Для этого использовали линию опухолевых клеток SK-BR-3, гиперэкспрессирующих рецептор ERBB2 на своей поверхности, в качестве отрицательного контроля использовали клетки линии СНО, не имеющие данного рецептора.

Клетки рассевали на 96-луночный планшет в количестве 35000 клеток/мл среды и в объеме 200 мкл суспензии на лунку и культивировали в среде McCoy's 5A (Life technologies, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки ("HyClone", Бельгия) в течение ночи. После этого культуральную среду меняли на среду, содержащую тестируемые белки

DARPin-PE40 и DARPin-LoPE в разных концентрациях. Клетки инкубировали при тех же условиях 72 ч.

Затем среду удаляли и в лунки вносили по 100 мкл раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ, ПанЭко) (0,5 мг/мл), приготовленного на среде McCoy's 5A, и инкубировали 1 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После этого раствор МТТ удаляли и к содержимому лунок добавляли по 100 мкл DMSO, планшет встряхивали на шейкере до полного растворения кристаллов формазана. Измерение оптического поглощения содержимого каждой лунки проводили на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария) на двух длинах волн: 570 нм (рабочая) и 650 нм (сравнение). Эксперименты были выполнены в трех повторностях. Выживание клеток после инкубации с белками оценивали по количеству формазана, образовавшегося в результате восстановления клетками МТТ-раствора и растворенного в DMSO (количество образовавшегося формазана пропорционально числу восстановительных эквивалентов в живых клетках). Результаты были выражены как доля от значения для необработанных клеток.

Численным выражением токсичности считали IC<sub>50</sub> –концентрацию белка в растворе, при которой количественный показатель восстановления бромида тетразолия составлял 50% от такового для необработанных клеток в отрицательном контроле. Построение кривых цитотоксичности и расчет IC<sub>50</sub> методом нелинейной регрессии проводили с использованием программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

### **2.3.1. Определение специфической цитотоксичности белка DARPin-miniSOG**

Опухолевые клетки SK-BR-3 рассеивали как описано выше и культивировали в течение ночи. Затем среду удаляли и в лунки добавляли по 100 мкл PBS (отрицательный контроль) или PBS, содержащего DARPin-miniSOG в концентрациях от 3 мкМ до 125 нМ. Клетки инкубировали с белком в течение 15 мин при +4°C, планшет помещали на термостатируемую платформу и облучали в течение 30 мин светом с длиной волны 460 нм интенсивностью 55 мВт/см<sup>2</sup> при температуре +37°C. После завершения облучения содержимое лунок заменяли на полную питательную среду и инкубировали клетки 72 ч при +37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ, как было описано выше. Для подтверждения механизма цитотоксичности рекомбинантного белка за счет генерации активных форм кислорода мы проводили облучение клеток описанным выше способом в присутствии аскорбиновой кислоты, выступавшей в роли антиоксиданта. Для установления

концентрации аскорбиновой кислоты, которая не снижает жизнеспособность клеток в условиях эксперимента, клетки рассеивали в 96-луночные планшеты как описано в п. 4, и инкубировали 90 мин с PBS, содержащем аскорбиновую кислоту в концентрациях от 2000 до 2 нМ. Максимальная концентрация аскорбиновой кислоты, не оказывавшая заметного цитотоксического влияния на все линии клеток, составила 60 нМ. Именно эту концентрацию использовали в дальнейшем при облучении клеток. Жизнеспособность клеток, облученных в присутствии аскорбиновой кислоты и без нее, также сравнивали по способности клеток восстанавливать бромид тетразолия.

#### **2.4. Оценка скорости интернализации комплекса ERBB2 с DARPIn-miniSOG методом проточной цитофлуориметрии**

Для оценки скорости интернализации белков DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG в комплексе с рецептором ERBB2 провели следующий эксперимент: клетки SK-BR-3 инкубировали 14 ч в среде McCoy's 5A, содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки, сняли с пластика и обработали белком DARPIn-miniSOG так, как это описано в пункте 2.2.2. После окрашивания и промывания клеток на льду часть окрашенных проб оставили на льду, часть при 37°C; интенсивность флуоресценции клеток измеряли спустя 10, 30 и 60 мин инкубации. Флуоресцентный сигнал измеряли так же, как в пункте 2.2.2, окрашивание определяли как разницу между средними значениями флуоресценции ( $\Delta\text{MFI}$ ) для окрашенных и неокрашенных клеток. В качестве контроля использовали клетки, окрашенные при 4°C в начале эксперимента.

Для подтверждения предположения о том, что при температуре 37°C происходит именно интернализация, а не диссоциация комплекса DARPIn-miniSOG с рецептором, исследовали динамику повторного окрашивания клеток SK-BR-3 после однократной инкубации с DARPIn-miniSOG в условиях, способствующих интернализации. Для этого клетки SK-BR-3 оставляли на 14 ч в среде с 1% эмбриональной телячьей сыворотки, затем снимали с пластика стерильным раствором Версена и дважды промывали стерильным PBS. Суспензию клеток в количестве  $4 \times 10^5$  в течение 30 мин инкубировали на льду в 250 мкл 1 мкМ раствора DARPIn-miniSOG в PBS, осаждали центрифугированием на охлажденной центрифуге в течение 1 мин при 800g, однократно промывали холодным PBS и делили на 4 части. Первую из них использовали для измерения уровня флуоресценции клеток, окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C. Для

контроля уровня базовой аутофлуоресценции использовали клетки, не окрашенные DARPin-miniSOG.

Остальные три части суспензии клеток (по  $1 \times 10^5$  клеток в каждой), однократно окрашенных белком DARPin-miniSOG при  $4^\circ\text{C}$ , помещали в среде McCoy's с 1% сывороткой в 24-луночный планшет и оставляли в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  при  $37^\circ\text{C}$  до следующего измерения. Через 4, 8 и 12 ч после первого измерения клетки второй, третьей и четвертой части, соответственно, снимали с пластика раствором Версена, дважды промывали PBS, половину оставляли для контроля уровня базовой флуоресценции, вторую половину инкубировали в течение 30 мин в 50 мкл 1 мкМ раствора DARPin-miniSOG на льду. После окончания инкубации клетки однократно промывали холодным PBS. Флуоресценцию DARPin-miniSOG измеряли в обеих полученных пробах для каждого временного интервала.

## **2.5. Изучение рециклизации рецептора после интернализации комплекса ERBB2/DARPin-miniSOG методом проточной цитофлуориметрии**

Клетки SK-BR-3 выращивали в течение 14 ч на среде McCoy's 5A, содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки. Культуральную среду удаляли, клетки снимали с пластика и дважды промывали стерильным PBS. Для удаления внеклеточного домена рецептора ERBB2 суспензию клеток  $1.5 \times 10^6$  инкубировали в 1% растворе папаина (AppliChem, Германия) при  $37^\circ\text{C}$  в течение 15 мин. Клетки промывали холодным PBS, делили на 7 частей. Первую часть (нулевой момент времени) делили пополам, одну половину ( $\sim 1,1 \times 10^5$  клеток) окрашивали белком DARPin-miniSOG (1 мкМ) при  $4^\circ\text{C}$ , вторая половина клеток служила контролем уровня аутофлуоресценции. Оставшиеся 6 частей клеток помещали в среде McCoy's с 1% сывороткой в 24-луночный планшет и оставляли в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  при  $37^\circ\text{C}$  на 2, 4, 8, 12, 24 и 72 ч, соответственно. По истечении указанного временного периода, клетки снимали с подложки раствором Версена, промывали холодным PBS, делили пополам, одну половину окрашивали белком DARPin-miniSOG как описано выше, вторую оставляли неокрашенной, и проводили измерение флуоресценции двух проб для каждого временного интервала.



## **2.6. Изучение интернализации белка DARPin-miniSOG в составе комплекса с рецептором ERBB2 и его внутриклеточной локализации методом конфокальной микроскопии**

Клетки SK-BR-3 рассеивали в планшет в лунки со стеклянным дном и помещали на ночь в инкубатор на 37°C в атмосферу с 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день клетки трансфецировали плазмидой pmKate-2-Lyso (Евроген). Данные плазмиды кодируют флуоресцентный белок mKate2, испускающий свет в дальней красной области спектра, соединенный с сигналом внутриклеточного транспорта: крысиный белок Lysosomal Associated Membrane Protein 1 (LAMP-1), обеспечивающий взаимодействие с мембраной лизосом и присоединенный к mKate2 через N-конец. Трансфекцию проводили при помощи реагента FuGene (Promega) согласно протоколу производителя. На следующий день клетки дважды промывали стерильным PBS и инкубировали с DARPin-miniSOG (500 нМ) в течение 1 часа при температуре 37°C. Затем клетки трижды отмывали PBS и исследовали при помощи конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM-710-NLO. Флуоресценцию DARPin-miniSOG детектировали при длине волны 458 нм, флуоресценцию mKate2 - при длине волны 561 нм. Анализ колокализации на основе полученных снимков проводили при помощи программного обеспечения Carl Zeiss LSM-710-NLO.

## **2.7. Установление причин снижения интенсивности флуоресценции белка DARPin-miniSOG в эндосоме**

Эксперименты по выявлению влияния pH и воздействия протеаз на DARPin-miniSOG, 4D5-miniSOG и ФМН проводили на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала, возбуждаемого светом с длиной волны 488 нм, и детектируемой при 535 нм. Белки в концентрации 35 мкМ инкубировались при температуре 37°C в буфере (100 мМ Tris, доведенный HCl до нужного значения pH), а также с разными ферментами в концентрации 40 мкМ (трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин (Sigma, США)) и восстановителями (дитиотриетол, глутатион (восстановленная и окисленная форма), аскорбиновая кислота, никотинамидадениндинуклеотид (NADH), NaBH<sub>4</sub> (Sigma, США)) в концентрации 10 мМ. Показания снимались сразу после добавления белка, спустя 1 час и 2 часа инкубации.

Для оценки влияния присутствия других хромофоров на интенсивность флуоресценции ФМН, DARPin-miniSOG в сравнении с DARPin-FITC использовали химический краситель трипановый синий (Sigma, США) в концентрации 0,1% и цитохром *c* в концентрации 300 мкМ.

Измерение флуоресценции образцов производили на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала, возбуждаемого светом с длиной волны 488 нм, и детектируемой при 535 нм. Показания снимались сразу после добавления хромофоров.

## **2.8. Установление механизма клеточной гибели клеток, подвергнутых воздействию адресных токсинов на основе DARPIn**

В качестве возможных механизмов клеточной гибели рассматривались два наиболее вероятных для клеток, культивируемых *in vitro*: апоптоз и некроз. В качестве критериев их отличия были выбраны проницаемость мембраны, экспозиция фосфатидилсерина на поверхности плазматической мембраны, наличие или отсутствие фрагментации ДНК [Kroemer, Galluzzi, 2008], а также морфология погибающих клеток [Kroemer и др., 2005].

Морфологию клеток и проницаемость клеточной мембраны оценивали при помощи флуоресцентной микроскопии. Для этого клетки помещали в PBS, содержащий 50 мкг/мл иодида пропидия, и визуализировали в проходящем свете и в красном канале флуоресценции.

Долю клеток с фрагментированной ДНК определяли при помощи проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки линии SK-BR-3 инкубировали с 50 нМ адресного токсина DARPIn-PE40 или DARPIn-LoPE в течение суток, клетки снимали с культурального пластика стерильным раствором Версена. В качестве положительного контроля апоптоза использовали клетки, проинкубированные в течение суток с 2 мкМ CaCl<sub>2</sub> либо с 5 мкМ стауроспорина в полной питательной среде. В случае белка DARPIn-miniSOG клетки линии SK-BR-3 снимали с культурального пластика при помощи раствора Версена, разделяли на пробы по 10<sup>5</sup> клеток, центрифугировали, отделяли от супернатанта и ресуспендировали в PBS, содержащем DARPIn-miniSOG в концентрации 1 мкМ, и облучали 30 минут при +37° С. В качестве контроля использовали пробу клеток, которую инкубировали в тех же условия без белка. В качестве контрольного образца апоптотических клеток использовали клетки, инкубированные 3 часа в растворе 2мМ CaCl<sub>2</sub> в PBS.

Клетки осаждали путем центрифугирования, добавляли к каждой пробе по 1 мл 70% этанола для фиксации, перемешивали и оставляли на льду на 30 минут. После этого клетки центрифугировали 5 мин при 1000g и температуре +4° С, супернатант сливали, а клетки ресуспендировали в 1 мл PBS, содержащего 50 мкг PI и 0,5 мг РНКазы А, и инкубировали 15

мин при комнатной температуре. Полученные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре BDAccuri C6.

Долю клеток с экспонированным на поверхности фосфатидилсеринном также оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии при помощи набора Annexin V-FITC staining kit (Biolegend, США) по протоколу производителя. Полученные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре BDAccuri C6, используя канал 533/30 для Annexin V-FITC и 670 LP для иодистого пропидия, либо NovoCyte, используя канал 530/30 для Annexin V-FITC и 586/20 для иодистого пропидия. Клетками и постклеточными элементами, подвергшимися апоптозу, считались те, что хорошо окрашивались аннексином V, конъюгированным с FITC, но слабо окрашивались иодистым пропидием, двойное окрашивание соответствовало вторичному некрозу.

## **2.9. Оценка противораковой эффективности, общей токсичности и иммуногенности белков на основе DARPin 9-29 *in vivo***

### **2.9.1. Животные**

Исследование общей токсичности и иммуногенности белков DARPin-LoPE и DARPin-PE40 было проведено на здоровых иммунокомпетентных мышах линии BALB/c. Исследование противоопухолевой активности проводили на мышах линии BALB/c-nude. Мыши были получены из вивария, свободного от известных патогенов (SPF, specified pathogen-free) Института Биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Животных содержали в вентилируемых полипропиленовых клетках, снабжали стерилизованной пищей и водой *ad libitum* и поддерживали чередование темноты и освещения в режиме 12/12 часов. Все экспериментальные вмешательства были согласованы с Комитетом по биоэтике Института Биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Мышей случайным образом распределяли на экспериментальные группы размером по 5-10 животных и содержали в каждой клетке мышей, относящихся к разным группам.

## 2.9.2. Схемы введения адресных токсинов DARPin-PE40 и DARPin-LoPE

Для исследования неспецифической токсичности и иммуногенности белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE эти белки и вводили здоровым иммунокомпетентным мышам линии BALB/c весом 18-22 г. Четыре инъекции проводили через день, затем в течение 32 дней мыши содержались в обычных условиях и курс инъекций повторяли. Мыши случайным образом были разделены на группы по 5 животных, которые получали DARPin-PE40 в количестве 10 мкг на инъекцию (4x10, 40 мкг за курс, суммарная доза 80 мкг) или DARPin-LoPE в количестве 10 мкг (4x10, 40 мкг за курс, суммарная доза 80 мкг) либо 20 мкг (4x20, 80 мкг за курс, суммарная доза 160 мкг). Белки вводили в объеме 100 мкл в фосфатно-солевом буфере (PBS, ПанЭко, Россия) в хвостовую вену, контрольная группа получала инъекции PBS.

Противоопухолевая активность белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE была оценена в Лаборатории оптической тераностики Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета имени Н.И. Лобачевского. Эффективность белка DARPin-PE40 изучали на ксенографтной модели рака молочной железы. Клетки линии SK-BR-3 вводились бестимусным мышам подкожно в количестве  $10^7$  в 200 мкл фосфатно-солевого буфера. Объем опухоли оценивали по двум диаметрам по формуле  $V = \text{длина} \times \text{ширина}^2 / 2$  [Geran и др., 1972], которые измеряли через день при помощи штангенциркуля. Через 9 дней после инокуляции, когда опухоли достигли размера около  $100 \text{ мм}^3$ , мыши были разделены на группы по 6 животных, DARPin-PE40 вводили через день внутривенно в хвостовую вену согласно следующим режимам: 5 доз по 5 мкг (25 мкг за курс), либо 5 доз по 10 мкг (50 мкг за курс), либо 4 дозы по 20 мкг (80 мкг за курс).

Исследование противоопухолевой активности DARPin-LoPE проводилось на флуоресцентной ксенографтной модели метастаз рака яичника [Sokolova и др., 2019]. Для этого мышам BALB/c-nude интраперитонеально вводили суспензию клеток SKOVip-kat в 200 мкл PBS в количестве 4 млн. клеток на животное. Визуализацию флуоресцирующих опухолей SKOVip-kat *in vivo* проводили на установке для флуоресцентного имиджинга (Институт прикладной физики РАН) с использованием узкополосного светодиода с максимумом излучения при 585 нм в качестве источника излучения и охлаждаемой цифровой CCD-камеры для регистрации сигнала. Для разделения возбуждающего света и эмиссии использовался фильтр с полосой пропускания 628-672 нм. Для оценки скорости роста опухолей флуоресцентную визуализацию проводили 2-3 раза в неделю в течение нескольких недель. В качестве количественного показателя роста опухоли оценивали динамику интегральной интенсивности флуоресцентного сигнала по площади брюшной полости мыши (F). Значение F

определяли по флуоресцентным изображениям в каждой временной точке с помощью программы ImageJ (National Institute of Health, США). Через 8 дней после инокуляции, когда опухоли достигали размера, соответствовавшего  $\sim 1 \times 10^6$  единиц флуоресценции, мышей разделяли на группы по 5-8 животных. DARPIn-LoPE вводили через день интраперитонеально в 200 мкл фосфатно-солевого буфера согласно следующим режимам: 5 инъекций по 5 мкг (25 мкг за курс) или 5 инъекций по 10 мкг (50 мкг за курс). Мыши контрольной группы получали инъекции PBS.

Все манипуляции проводились под общей анестезией: 1,8 мг золетила и 32 мг ксилазина гидрохлорида (рометар) вводились внутривентрально в 100 мкл PBS.

### **2.9.3. Оценка неспецифической токсичности адресных токсинов**

Во время курса введения белков проводилась ежедневная оценка внешнего вида и подвижности животных, и измерялся вес тела, в промежутке между курсами вес тела измеряли раз в 5 дней. В ходе эксперимента у животных из лицевой вены производили забор крови для анализа клеточного состава крови, активности трансаминаз и определения титра антител, специфичных к вводимым белкам. График исследований предусматривал не более одного забора крови в день.

Анализ лейкоцитов в крови животных проводили до начала инъекций, на 8 и 17 дни после начала первого курса инъекций, а также на 47 (8 день после начала второго курса инъекций) и 56 (17 после начала второго курса инъекций) дни эксперимента. Для этого 20 мкл цельной крови смешивали с 10 мкл раствором гепарина, содержащего 50 единиц активности (Синтез АКОМП, Россия), а затем добавляли 500 мкл лизирующего буфера и инкубировали в течение 10 мин на льду. После этого добавляли 600 мкл PBS и центрифугировали при 100g в течение 10 мин при +4 °C. Процедуру лизиса и центрифугирования повторяли, финально ресуспендируя клетки в 100 мкл PBS 1% БСА. Полученные лейкоциты анализировали на проточном цитофлуориметре NovoCyte (Асеа, США). По прямому и боковому светорассеянию (SSC-A/FSC-A) клетки отделяли от дэбриса, затем внутри гейта лейкоцитов выделяли популяции лимфоцитов (малые, негранулярные) и гранулоцитов нейтрофилов (средние, гранулярные). Для каждой популяции записывали количество событий и долю данной популяции среди всех лейкоцитов. Значимость различий между группами оценивали по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони.

Анализ активности ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартаттрансаминазы (АСТ) в сыворотке крови мышей проводили до начала инъекций адресных токсинов, на 6 и 18

дни после начала первого курса инъекций, а также на 45 (6 день после начала второго курса инъекций) и 57 (18 после начала второго курса инъекций) дни эксперимента. Измерение активности ферментов проводили по Райтману-Френкелю с помощью диагностических наборов (Ольвекс Диагностикум, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Оптическая плотность реакционной среды, пропорциональная активности трансаминаз, измерялась фотометрически при длине волны 560 нм на спектрофотометре Infinite M1000 Pro (Tecan, Швейцария).

Для гистологического анализа были взяты селезенка, печень, сердце, легкие и почки после эвтаназии животных на 90 день эксперимента. Органы фиксировали 4% раствором формальдегида в фосфатно-солевом буфере, кусочки фиксированных органов были обезвожены в спиртах восходящей концентрации и заключены в парафин. Гистологические срезы изготавливали на ротационном микротоме Leica RM2255, толщина среза составляла 3 микрона. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и заключали под стекло в среде Acrytol (Leica Microsystems CMS, Germany). Исследование проводили на светооптическом уровне с использованием микроскопа DMI6000B (Leica Microsystems CMS, Germany), при увеличении X100, X200, X400.

#### **2.9.4. Оценка иммуногенности адресных токсинов**

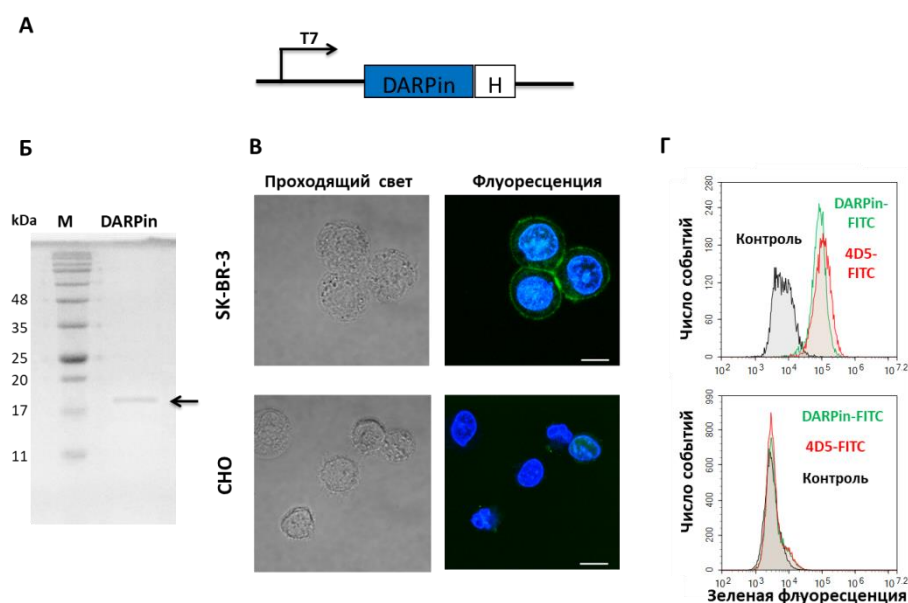
Иммуногенность DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE оценивали по изменению титра антител, специфических к исследуемым белкам, в сыворотке крови животных. Определение титра специфических антител проводили в формате твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) до начала эксперимента, на 20, 27, 60 и 80 дни. Darpin-PE40 и Darpin-LoPE40 в количестве 500 нг сорбировали в 96-луночной планшете для ИФА (Corning, США) в карбонат-бикарбонатном буфере (4 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,2) в течение ночи при 4°C. Несвязавшийся антиген трижды отмывали PBS с 0,05% Tween20 и инкубировали в течение часа в 3% молоке, приготовленном на PBS, при комнатной температуре для блокировки неспецифического связывания. Затем в лунки добавляли исследуемые сыворотки в 1% БСА, приготовленном на PBS, и инкубировали в течение часа, после чего промывали PBS с 0,05% Tween-20 3 раза. После этого лунки инкубировали с поликлональными козьими антимышинными антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой (Jackson ImmunoResearch, UK), разведенные в PBS с 1% БСА 1:500, в течение часа при комнатной температуре. Несвязавшиеся антитела отмывали 5 раз PBS с 1% Tween-20. Затем лунки инкубировали с р-

нитрофенил-фосфатом 10 мг/мл в глициновом буфере (0,1М глицин, 1мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 10,4). После развития окрашивания реакцию останавливали 3М раствором NaOH и измеряли оптическое поглощение содержимого лунок на длине волны 405 нм с использованием планшетного спектрофотометр Infinite M1000 Pro (Tecan, Швейцария). Сыворотку тестировали в разведениях 1:15, 1:50, 1:140, 1:400, 1:1000, 1:3500, 1:10 000, 1:30 000, 1:100 000, 1: 300 000, 1:900 000, в двух повторностях. Титр определяли как минимальное разведение, при котором сигнал достоверно отличался от контроля – лунок, в которые не добавляли сыворотку. Критерием достоверности считали отличие по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони.

## ГЛАВА III. Результаты и обсуждение

### 3.1. Выделение и характеристика белка DARPin

Для получения DARPin 9-29 была создана генетическая конструкция на базе плазмиды pET-22b (Рисунок 7 А), белок DARPin 9-29 был наработан в цитоплазме *Escherichia coli* штамма BL21(DE3). Белок присутствовал преимущественно в растворимой фракции и был очищен никель-аффинной хроматографией, электрофорез очищенного белка представлен на рисунке 6Б. Выход чистого белка составил 60 мг с 1 л жидкой культуры. Для проверки функциональных свойств DARPin 9-29 белок был конъюгирован с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Полученный DARPin-FITC специфично связывался с клетками аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующими ERBB2, и не связывался с линией клеток яичника китайского хомячка CHO, не имеющими данного рецептора, что подтверждено проточной цитометрией и флуоресцентной микроскопией (Рисунок 7).



**Рисунок 7.** DARPin 9-29. **А.** Схема генетической конструкции: T7 – промотор РНК-полимеразы фага T7, DARPin – DARPin 9-29, H – гексагистидиновая последовательность для очистки белка. **Б.** Очищенный белок, денатурирующий электрофорез по Лэммли: М – стандарты молекулярных масс белков, DARPin – очищенный белок DARPin 9-29. **В.** Флуоресцентная микроскопия клеток SK-BR-3 и CHO, окрашенных DARPin-FITC. **Г.** Окраска клеток SK-BR-3 белком DARPin, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), проточная цитофлуориметрия.

Таким образом, DARPin 9-29 был успешно наработан в бактериальной системе экспрессии, выделен из растворимой фракции, его специфичность связывания ERBB2 была подтверждена *in*

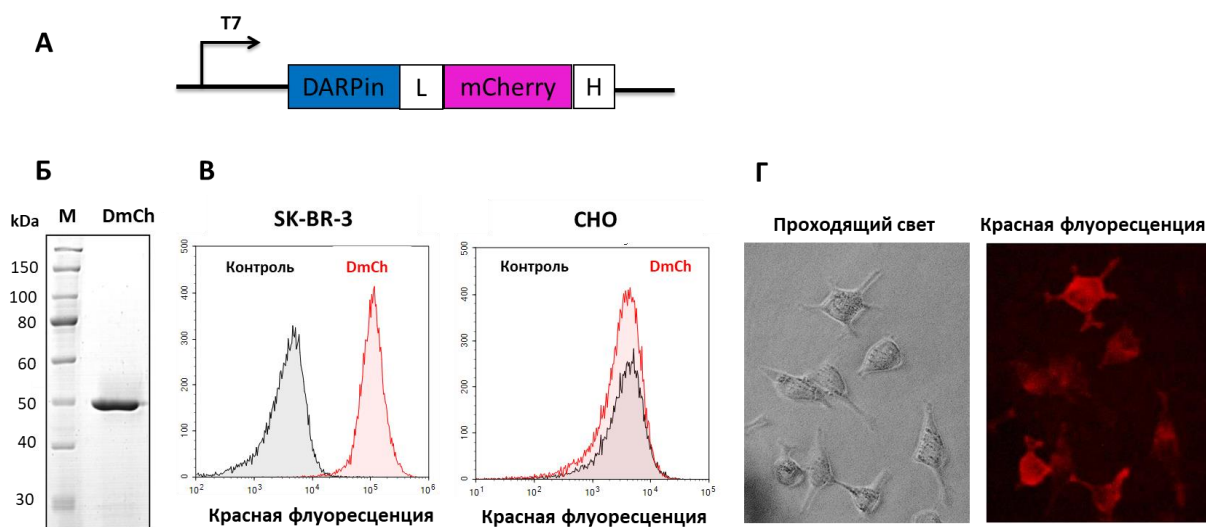


*in vitro*. Следующим шагом стала проверка функциональных свойств модуля DARPin 9-29 в составе рекомбинантных белков слияния.

### 3.2. Выделение и характеристика рекомбинантного белка DARPin-mCherry

Как и полноразмерные антитела, дарпины могут использоваться для доставки визуализирующих модулей, в том числе флуоресцентных белков. Преимуществом дарпинов является то, что их можно не только конъюгировать с флуорофорами, но и соединять с флуоресцентными или биолюминисцентными белками на уровне генетической конструкции. DARPin 9-29 был таким образом соединен с дальнекрасным флуоресцентным белком mCherry, который за счет своих спектральных свойств может использоваться как *in vitro*, так и *in vivo* для визуализации опухолей в модельных животных [Vorobjagin и др., 2010]. Генетическая конструкция была создана на базе плазмиды pET-22b, функциональные модули были соединены гибким линкером на основе шарнирного региона тяжелой цепи иммуноглобулина IgG3 мыши, для очистки использовалась гексагистидиновая последовательность. Схема конструкции представлена на рисунке 8А.

Белок DARPin-mCherry был наработан в цитоплазме *E. coli* и очищен никель-аффинной хроматографией, большая часть целевого белка содержалась в растворимой фракции. Эффективная индукция экспрессии белка, его высокое содержание в цитоплазме и агрегационная стабильность облегчили его очистку, выход чистого белка составил 40 мг с 1 литра культуры. DARPin-mCherry был протестирован *in vitro* при помощи проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. DARPin 9-29 специфично связывался с ERBB2, и белок DARPin-mCherry избирательно окрашивал ERBB2-гиперэкспрессирующие клетки линии SK-BR-3, но не окрашивал клетки CHO, не имеющие данного рецептора (Рисунок 8 В).



**Рисунок 8.** DARPin-mCherry. **А.** Схема генетической конструкции: T7 – промотор РНК-полимеразы фага T7, DARPin – DARPin\_9-29, L – гибкий линкер из шарнирного региона тяжелой цепи иммуноглобулина IgG3 мыши (EFPKPSTPPGSSGGAP), mCherry – флуоресцентный белок mCherry, H – гексагистидиновая последовательность для очистки белка. **Б.** Очищенный белок, денатурирующий электрофорез по Лэммли: М – стандарты молекулярных масс белков, DmCh – очищенный белок DARPin-mCherry, молекулярная масса 46 кДа. **В.** Окраска клеток SK-BR-3 и CHO белком DARPin-mCherry, проточная цитофлуориметрия. **Г.** Флуоресцентная микроскопия клеток SK-BR-3, окрашенных DARPin-mCherry.

Аффинность белка DARPin-mCherry к ERBB2 была также измерена методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе BIAcore, в качестве мишени использовался иммобилизованный рекомбинантный p185HER2-ECD.  $K_D$  составила 4,5 нМ, что незначительно отличается от  $K_D$  DARPin 9-29 (3,8 нМ).

Таким образом, DARPin 9-29 сохранил свои свойства в составе белка слияния и позволил специфично окрасить ERBB2-гиперэкспрессирующие клетки. В дальнейшем в рамках данной работы DARPin 9-29 был использован для доставки белковых токсинов с различным механизмом действия.

Сам полученный в ходе работы белок DARPin-mCherry был использован для функционализации апконвертирующих наночастиц. Фототоксичные частицы доставлялись кровотоком к ERBB2-гиперэкспрессирующей опухоли за счет адресного модуля DARPin и позволяли неинвазивно визуализировать опухоль в животных за счет флуоресцентного модуля mCherry [Mironova и др., 2017]. Таким образом, белок DARPin-mCherry стал компонентом тераностического агента, способного специфически воздействовать на раковые клетки, одновременно детектируя их внутри организма.

### 3.3. Выделение и характеристика рекомбинантного белка DARPin–miniSOG

Для создания полностью генетически кодируемого адресного фототоксина DARPin 9-29 был соединен с фототоксичного белка miniSOG. Этот белок был получен из LOV2-домена фототропина 2 *Arabidopsis thaliana*, чувствительного к синему свету. Природный белок запускает внутриклеточный сигнальный каскад за счет изменения конформации, однако miniSOG под действием синего света генерирует активные формы кислорода, что позволяет использовать его в фототерапии. Ранее в нашей лаборатории был сконструирован другой ERBB2-специфичный белок 4D5scFv-miniSOG, адресным модулем для которого послужил одноцепочечный вариант антитела 4D5. 4D5scFv-miniSOG показал специфическую фотоиндуцированную токсичность в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих раковых клеток, IC<sub>50</sub> составила 160 нМ [Mironova и др., 2013]. Недостатком 4D5scFv-miniSOG являлась его склонность к агрегации, усложнявшая его наработку в бактериальной системе: большая часть белка оказывалась в тельцах включения, а очистка, включающая денатурацию и рефолдинг, осложнялась диссоциацией нековалентно связанного кофактора, флавинмононуклеотида. Возможным решением было использование в качестве адресного модуля DARPin 9-29, показавшего свою способность к простой и эффективной наработке в бактериальной системе экспрессии.

Фототоксин miniSOG был соединен с адресным модулем DARPin 9-29 в конструкции, аналогичной таковой для DARPin-mCherry (Рисунок 9), рекомбинантный белок был наработан в цитоплазме *E. coli* и очищен никель-аффинной хроматографией, выход составил 15 мг чистого белка с 1 л жидкой культуры.



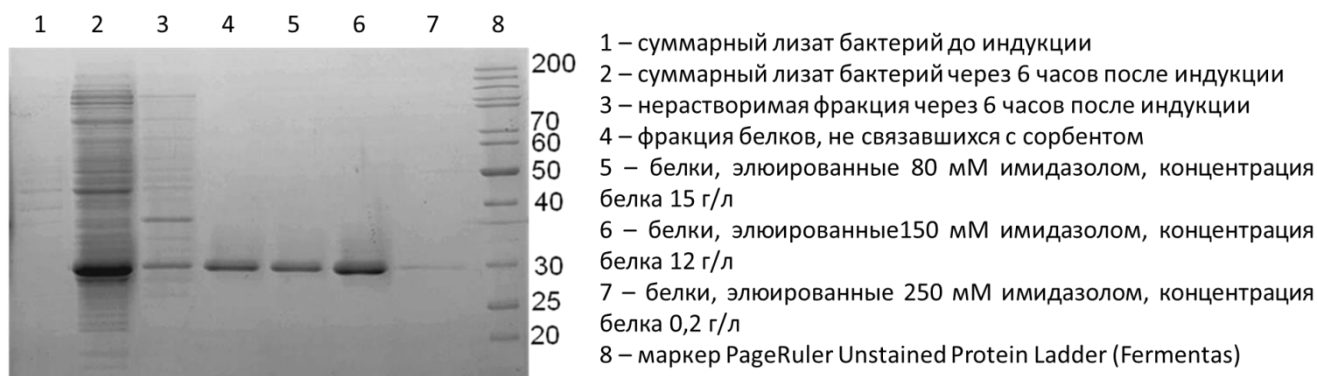
**Рисунок 9.** Схема генетической конструкции DARPin-miniSOG: T7 – промотор РНК-полимеразы фага T7, DARPin – DARPin\_9-29, L – гибкий линкер из шарнирного региона тяжелой цепи иммуноглобулина IgG3 мыши (EFPKPSTPPGSSGGAP), miniSOG – фототоксичный белок miniSOG, H – гексагистидиновая последовательность для очистки белка.

#### 3.3.1.Нарработка и выделение белка DARPin-miniSOG

Для получения рекомбинантного белка DARPin-miniSOG клетки штамма BL21(DE3) трансформировали плазмидой pET-DARPin-miniSOG. Нарработку биомассы, содержащей целевой белок, проводили как описано в разделе «Материалы и методы». Методика, описанная

в п. 2.1 раздела «Материалы и методы», позволяет получить 15 мг чистого DARPin-miniSOG с 1 л культуры *E. coli*, при этом белок экспрессируется преимущественно в растворимой форме.

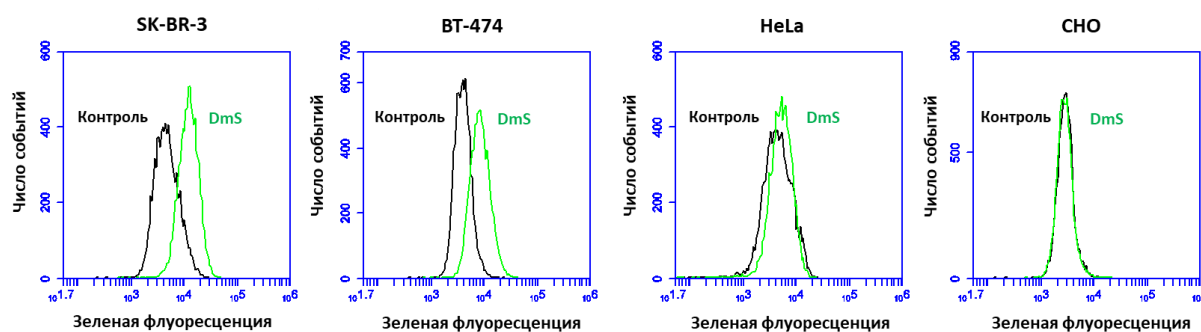
При ступенчатой элюции белка использовали следующие концентрации имидазола: 80, 100, 150, 200, 250 мМ. Максимальная концентрация белка была получена во фракции, содержащей 80 мМ имидазола (Рисунок 10).



**Рисунок 10** Выделение белка DARPin-miniSOG, результат электрофореза в денатурирующих условиях.

### 3.3.2. Подтверждение способности рекомбинантного белка DARPin-miniSOG специфично связываться с клетками методом проточной цитофлуориметрии

Несмотря на низкую интенсивность флуоресценции модуля miniSOG, он может использоваться как самостоятельный флуоресцентный краситель. Окрашивание клеток линий SK-BR-3, BT-474, HeLa и CHO коррелировало с плотностью рецептора ERBB2 на поверхности данных клеток согласно литературным данным [Сао и др., 2014; Sarup и др., 1991]. Гистограммы распределения флуоресценции клеток, обработанных DARPin-miniSOG, в сравнении с необработанным контролем приведены на рисунке 11. Наибольший уровень окрашивания, оцененный по среднему значению флуоресценции, наблюдался для клеток аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 и BT-474, гиперэкспрессирующих на своей поверхности рецептор ERBB2. В меньшей степени окрашивались клетки аденокарциномы шейки матки HeLa, имеющие нормальное для эпителия количество молекул ERBB2, клетки яичника китайского хомячка CHO, не имеющие молекулы ERBB2, не окрашиваются DARPin-miniSOG.

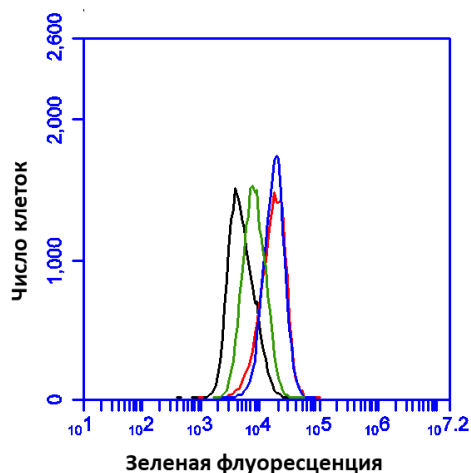


**Рисунок 11.** Сравнение флуоресценции клеток линий SK-BR-3, BT-474, HeLa и CHO инкубированных с DARPin-miniSOG, измеренной методом проточной цитометрии. Контроль – необработанные клетки, DmS – клетки, окрашенные DARPin-miniSOG.

Для того чтобы подтвердить, что связывание белка DARPin-miniSOG с поверхностью клеток обусловлено специфичным взаимодействием с рецептором ERBB2, был проведен конкурентный анализ. Клетки линии SK-BR-3 инкубировали с белком DARPin-miniSOG и измеряли флуоресцентный сигнал в сравнении с клетками, не обработанными белком DARPin-miniSOG. В другой пробе помимо белка DARPin-miniSOG в том же количестве присутствовал белок DARPin 9-29, не дающий флуоресцентного сигнала. Так как этот белок в виде адресного модуля входит в состав DARPin-miniSOG и связывается с тем же эпитопом первого домена внеклеточной части ERBB2, то может выступать в качестве конкурирующего агента и будет влиять на уровень окрашивания в том случае, если взаимодействие специфично. В третьей пробе помимо DARPin-miniSOG в том же количестве присутствовал белок 4D5scFv, также не дающий флуоресцентного сигнала, но связывающийся с IV внеклеточным доменом молекулы ERBB2.

Индекс окраски (staining index) для DARPin-miniSOG составил 2,07, для смеси DARPin-miniSOG с 4D5scFv он был равен 2,13, а для смеси DARPin-miniSOG с DARPin 9-29 индекс окраски был равен 0,53. Отсюда можно заключить, что нефлуоресцирующий DARPin 9-29 конкурировал с белком DARPin-miniSOG за связывание с эпитопом, а значит, взаимодействие с поверхностью клеток определяется модулем DARPin, и модуль miniSOG не вносит неспецифического взаимодействия. Гистограммы распределения флуоресценции соответствующих образцов клеток приведены на рисунке 12. В дальнейшем способность DARPin-miniSOG специфично связываться с ERBB2 на поверхности клеток и возможность квантифицировать сигнал за счет стехиометрического соотношения связывающего модуля и флуорофора была использована для изучения способов различения целевого сигнала от

автофлуоресценции, при этом DARPin-miniSOG использовался в качестве тусклого флуоресцентного красителя [Shilova, Shilov, Deyev, 2017].



Образец	Зеленая флуоресценция, у.е.
Неокрашенные клетки	$5,3 \cdot 10^3$
DARPin-miniSOG	$18,1 \cdot 10^3$
DARPin-miniSOG + 4D5scFv	$18,4 \cdot 10^3$
DARPin-miniSOG + DARPin	$8,6 \cdot 10^3$

**Рисунок 12.** Средняя интенсивность флуоресценции клеток SK-BR-3, не инкубированных с белком DARPin-miniSOG (черная линия, контроль), клеток, обработанных DARPin-miniSOG (красная линия), смесью DARPin-miniSOG и DARPin 9-29 (зеленая линия), и смесью DARPin-miniSOG и 4D5scFv (синяя линия).

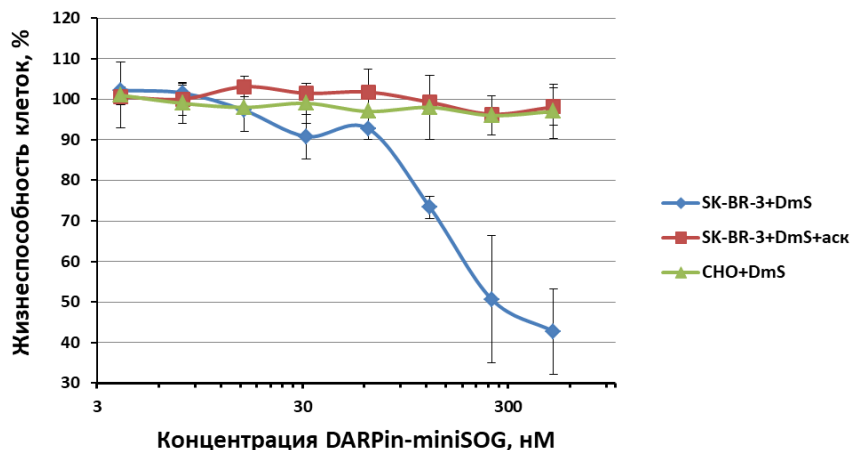
Кроме того тот факт, что одноцепочечное антитело 4D5 не влияло на эффективность связывания DARPin-miniSOG, позволяет в дальнейшем создавать гибридные молекулы для визуализации или терапии, содержащие оба этих связывающих модуля для повышения константы связывания таких агентов.

Помимо подтверждения способности белка DARPin-miniSOG специфично связываться с поверхностью клеток сотрудниками нашей лаборатории была определена константа взаимодействия данного белка с рецептором ERBB2. Константа диссоциации, оцененная с помощью плазмонно-поверхностного резонанса, составляет 5 нМ (опыты выполнены в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН Стрёмовским О.А.).

### 3.3.3. Определение токсичности DARPin-miniSOG в отношении ERBB2-положительных клеток

Чтобы определить токсическое действие адресного генетически кодируемого фотосенсибилизатора DARPin-miniSOG использовали клетки линии SK-BR-3, показавшие максимальный уровень экспрессии рецептора ERBB2. Жизнеспособность клеток определяли с

помощью МТТ-теста как описано в п. 2.3.1 раздела «Материалы и методы».  $IC_{50}$  для клеток этой линии составила 0,8 мкМ (Рисунок 13).

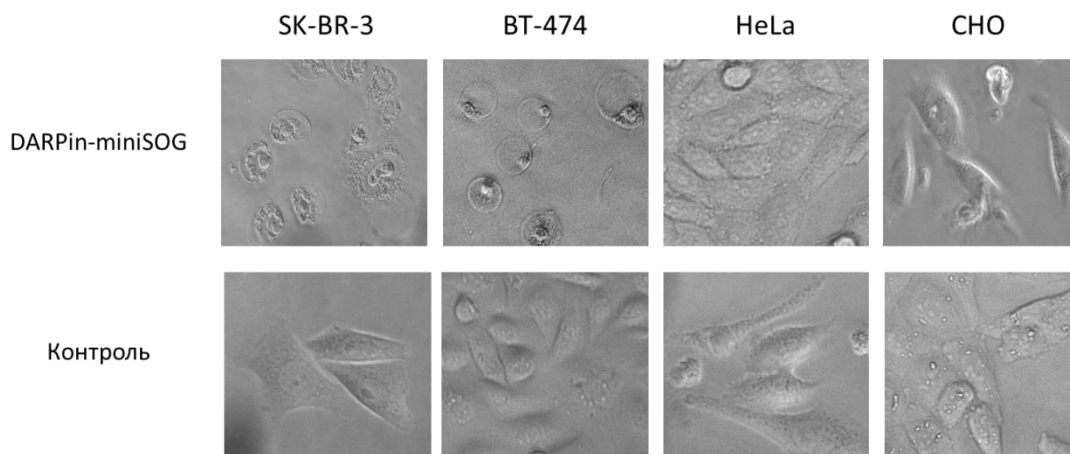


**Рисунок 13.** Токсичность белка DARPin-miniSOG в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих клеток SK-BR-3, измеренная методом МТТ: SK-BR-3 – клетки аденокарциномы молочной железы, CHO – клетки яичника китайского хомячка. В присутствии 60 нМ аскорбиновой кислоты токсичность DARPin-miniSOG снижается, что доказывает прооксидантный механизм токсичности данного белка.

Облучение синим светом в отсутствие DARPin-miniSOG не влияло на жизнеспособность клеток. Ранее для модуля DARPin 9-29 было показано, что сам по себе он не оказывает токсического действия на раковые клетки [Jost и др., 2013], следовательно, присоединение DARPin-miniSOG к ERBB2 на поверхности клетки не должно было повлиять на их жизнеспособность. Для подтверждения участия активных форм кислорода, генерируемых модулем miniSOG, в цитотоксическом действии белка опыт с облучением клеток SK-BR-3 был проведен в присутствии антиоксиданта. В качестве протекторной молекулы использовалась аскорбиновая кислота, предварительно была установлена ее концентрация, не оказывающая влияния на жизнеспособность клеток в условиях эксперимента. При облучении клеток SK-BR-3 в присутствии 60 нМ аскорбиновой кислоты в выбранном диапазоне концентраций  $IC_{50}$  повысилась примерно на порядок (Рисунок 13). Таким образом, присутствие антиоксиданта снижало токсичность фотосенсибилизатора DARPin-miniSOG для клеток SK-BR-3, что подтверждает механизм действия белка, связанный с индукцией окислительного стресса.

### 3.3.4. Установление механизма гибели клеток, подвергнутых воздействию адресного фототоксина DARPin-miniSOG

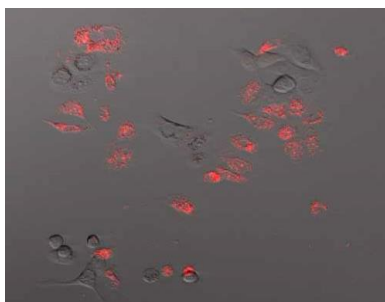
Окислительный стресс затрагивает все физиологические процессы клетки и влияет на многие пути внутриклеточного сигналинга [Circu, Aw, 2010]. В ответ на повреждение клетки активными формами кислорода в культуре клеток наиболее вероятными путями гибели являются некроз и апоптоз [Valencia, Morán, 2004]. При облучении ERBB2-сверхэкспрессирующих клеточных линий наблюдалось заметное изменение морфологии клеток: увеличивался объем цитоплазмы, появлялась заметная гранулярность, клетки теряли характерную распластанную форму. При этом в большинстве клеток не наблюдалось формирование апоптотических телец. Таким образом, на основе морфологических критериев можно сделать предварительный вывод о том, что механизмом клеточной гибели является некроз (рис. 14).



**Рисунок 14.** Морфология клеток различных модельных линий через 1 ч после облучения в присутствии DARPin-miniSOG.

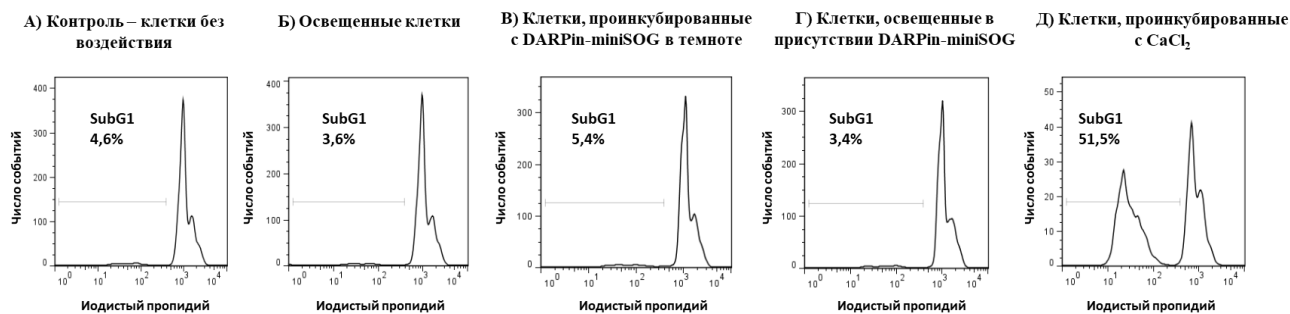
Цитологический критерий также указывает на некроз, так как после облучения клеток в присутствии DARPin-miniSOG их плазматическая мембрана становится проницаемой для иодида пропидия (PI) (Рисунок 15).





**Рисунок 15.** Нарушение целостности мембраны клеток SK-BR-3, обработанных DARPin-miniSOG и подвергнутых облучению. Клетки окрашены PI через 1 ч после облучения. Микрофотография сделана на конфокальном микроскопе ZeissLSM 510.

Измерение количества ДНК в клетках и постклеточных элементах после облучения клеток линии SK-BR-3 в присутствии DARPin-miniSOG показывает, что в большинстве клеток остается исходное количество ДНК, а фракция потерявших часть фрагментированной ДНК клеток SubG<sub>1</sub> остается на количественном уровне отрицательного контроля. Таким образом, токсическое действие белка DARPin-miniSOG не приводит к фрагментации ДНК и уменьшению ее содержания в постклеточных структурах, а значит не связано с индукцией апоптоза (Рисунок 16).



**Рисунок 16.** Гистограммы, отражающие содержание гиподиплоидной ДНК в клетках линии SK-BR-3, подвергнутых действию фотосенсибилизатора DARPin-miniSOG, и контрольных клетках.

Небольшое повышение доли гиподиплоидных клеток и постклеточных элементов наблюдалось только под действием облучения, клетки, обработанные DARPin-miniSOG и освещенные синим светом, не приближались по содержанию клеток с гиподиплоидной ДНК к такому для клеток, обработанных хлоридом кальция.

Таким образом, можно заключить, что гибель ERBB2-сверхэкспрессирующих клеток, вызываемая облучением синим светом в присутствии DARPIn-miniSOG, происходит по механизму некроза. Несмотря на то, что некроз считается менее предпочтительным механизмом гибели раковых клеток из-за индукции воспаления [Karsch-Bluman и др., 2019], он может способствовать вовлечению врожденного и адаптивного иммунитета в борьбу с раком. При нарушении целостности мембраны во внеклеточное пространство высвобождаются молекулы, сигнализирующие об опасности (Danger Associated Molecular Patterns, DAMP), активирующие клетки иммунной системы: кальретикулин, АТФ, амфотерин (high-mobility group box 1, HMGB1), интерфероны первого типа, нуклеиновые кислоты раковых клеток и аннексин А1 (ANXA1) [Galluzzi и др., 2018]. Такое усиление ответа за счет иммунной системы показано для фотодинамической терапии препаратами на основе гиперическогоина, для некоторых типов химиотерапии и радиотерапии [Buytaert, Dewaele, Agostinis, 2007; Kroemer и др., 2013].

Вероятно, раковые клетки погибают в присутствии DARPIn-miniSOG преимущественно по механизму некроза из-за повреждений плазматической мембраны, повышающих ее неспецифическую проницаемость. Повышенная доступность цитоплазмы для компонентов внеклеточной среды была подтверждена окрашиванием клеток иодистым пропидием (Рисунок 15). Это свойство DARPIn-miniSOG можно использовать для избирательного повышения проницаемости раковых клеток для других препаратов, так как доставка токсинов внутрь перерожденных клеток по-прежнему является актуальной проблемой в лечении рака [Shilova и др., 2018]. Такая комбинированная терапия позволяет надеяться на синергетический эффект за счет двух разных агентов, такое сочетанное действие было показано для таксола и белка 4D5scFv-miniSOG [Mironova и др., 2013].

### **3.3.5. Подтверждение интернализации комплекса DARPIn-miniSOG с рецептором ERBB2 методом проточной цитофлуориметрии**

При варьировании условий облучения нами была замечена зависимость влияния DARPIn-miniSOG на жизнеспособность клеток от температуры, при которой происходило инкубирование и облучение: при низкой температуре токсический эффект оказывался сильнее ( $IC_{50}$  при  $4^{\circ}C$  снижалась с  $0,8 \mu M$  до  $0,2 \mu M$ ). Так как низкая температура препятствует интернализации рецептора, мы предположили, что максимальное повреждающее действие этот белок оказывает в том случае, если задерживается на мембране. Отличие в динамике

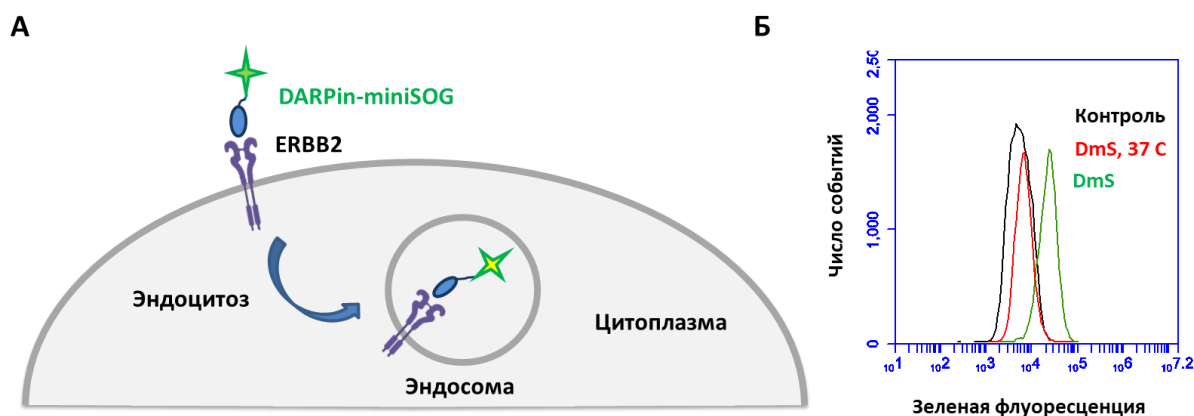
интернализации или судьбе белка после интернализации в комплексе с рецептором могли бы объяснить более высокую  $IC_{50}$  белка DARPin-miniSOG по сравнению с 4D5scFv-miniSOG.

Поскольку данные, касающиеся способности и особенностей интернализации ERBB2, на данный момент противоречивы и сводятся к описанию конкретных экспериментальных моделей [Austin и др., 2004; Hommelgaard, Lerdrup, Deurs, 2004], для интерпретации полученных результатов нам потребовалось исследовать возможность интернализации комплекса DARPin-miniSOG/ ERBB2.

Мы предположили, что комплекс DARPin-miniSOG и ERBB2 способен к интернализации. В таком случае мы ожидали увидеть снижение флуоресцентного сигнала от DARPin-miniSOG после инкубации обработанных им клеток при высокой температуре по сравнению с клетками, инкубированными на холоду, так как низкая температура замедляет процесс интернализации. Для проверки этой гипотезы клетки, инкубированные на льду с DARPin-miniSOG и отмытые от не связавшегося белка, разделили на 2 части. Одну часть оставили на 10 минут при температуре 4°C, вторую - при температуре 37°C. Затем измерили интенсивность флуоресценции в канале FL1 для обеих проб. Оказалось, что уже через 10 минут при температуре 37°C средний уровень флуоресценции падает примерно в 2 раза по сравнению с таковым для клеток, выдержанных то же время при температуре 4°C, а индекс окраски падает в 5,5 раз (см. Таблицу 1 и Рисунок 17).

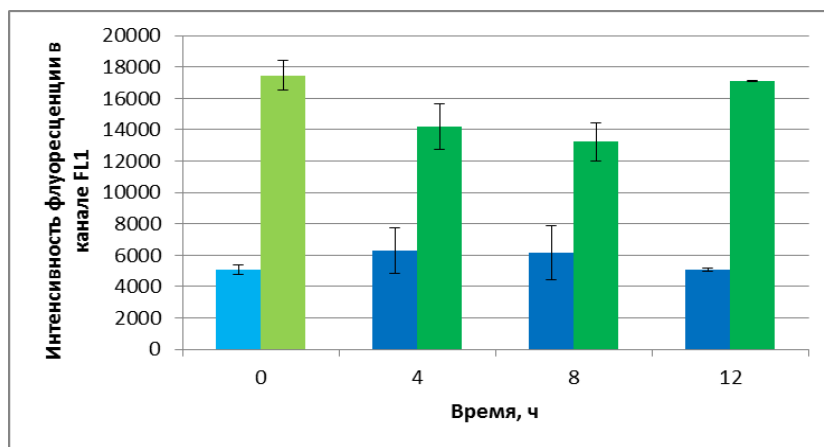
**Таблица 1. Средние значения флуоресценции и индекса окраски для клеток, проинкубированных после обработки DARPin-miniSOG при разной температуре в течение 10 минут.**

Проба	Средний уровень флуоресценции в канале FL1	Индекс окраски по сравнению с неокрашенными клетками
Неокрашенные клетки	$4,9 \cdot 10^3$	
Клетки, проинкубированные после обработки DARPin-miniSOG при 4°C	$1,5 \cdot 10^4$	1,6
Клетки, проинкубированные после обработки DARPin-miniSOG при 37°C	$6,7 \cdot 10^3$	0,3



**Рисунок 17.** Интернализация DARPin-miniSOG в комплексе с ERBB2. А. Схема процесса гашения флуоресценции DARPin-miniSOG при его интернализации в комплексе с рецептором ERBB2. Б. Снижение интенсивности флуоресценции DARPin-miniSOG при его интернализации, детектируемое проточной цитометрией, гистограммы отражают флуоресценцию клеток SK-BR-3. Контроль – неокрашенные клетки, DmS – клетки, окрашенные DARPin-miniSOG, DmS, 1ч – клетки, окрашенные DARPin-miniSOG и проинкубированные при 37°C в течение часа.

Исходя из полученных данных видно, что при температуре 37°C сигнал быстро снижается, что наиболее вероятно объясняется интернализацией рецептора. При уходе ERBB2 в эндосомы мы также ожидали бы снижения количества рецептора на поверхности клеток после их инкубации с DARPin-miniSOG, что должно отразиться на интенсивности флуоресценции при повторном окрашивании белком. Для проверки этой гипотезы был проведен эксперимент, описанный в п.4 раздела «Материалы и методы». Клетки, единожды окрашенные DARPin-miniSOG, были помещены в питательную среду, содержащую 1% эмбриональной телячьей сыворотки и оставлены в CO<sub>2</sub>-инкубаторе на 4,8 и 12 часов, по истечению которых часть клеток снова снимали с пластика и измеряли уровень автофлуоресценции и уровень флуоресценции при повторном окрашивании DARPin-miniSOG. Как видно из гистограммы на рисунке 18, средняя интенсивность флуоресценции при повторном окрашивании была ниже, чем исходная, в 1,2 раза через 4 часа и в 1,3 раза через 8 часов. Одновременно со снижением среднего уровня флуоресценции наблюдалось небольшое повышение флуоресценции единожды окрашенных клеток. Через 12 часов средний уровень флуоресценции клеток, повторно проинкубированных с DARPin-miniSOG, возвращался к исходному.



**Рисунок 18.** Изменение среднего уровня флуоресценции клеток SK-BR-3, обработанных адресным белком DARPin-miniSOG.

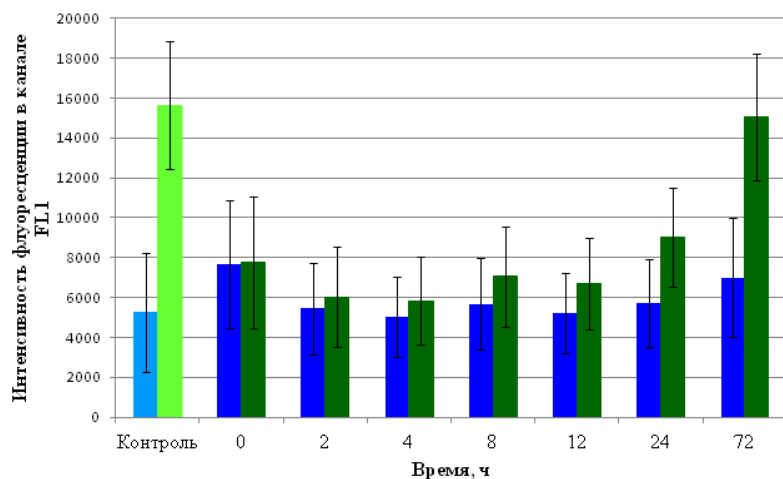
Голубой столбец на гистограмме показывает уровень исходной аутофлуоресценции клеток SK-BR-3, светло-зеленый столбец – уровень флуоресценции клеток SK-BR-3, однократно обработанных белком DARPin-miniSOG при 4°C (0 часов). Синие столбцы соответствуют уровню флуоресценции, сохранившемуся после обработки клеток белком DARPin-miniSOG при 4°C и последующей инкубации при 37°C в течение 4, 8 и 12 ч. Темно-зеленые столбцы соответствуют уровню флуоресценции клеток, повторно обработанных белком DARPin-miniSOG при 4°C, после первого окрашивания и инкубации при 37°C в течение 4, 8 и 12 ч. Планки погрешностей на гистограмме показывают стандартное отклонение, посчитанное по результатам двух независимых экспериментов.

Очевидно, что достоверные отличия уровня повторного окрашивания спустя 4 и 8 часов по сравнению с исходным уровнем окрашивания связаны с тем, что часть рецептора уходит с мембраны после первого окрашивания DARPin-miniSOG. Через 12 часов уровень окрашивания восстанавливается, что может объясняться как полным возвращением интернализовавшегося ERBB2 на мембрану, так и синтезом новых молекул рецептора.

### **3.3.6. Оценка вклада рециклизации в восстановление исходного количества рецептора на мембране после интернализации комплекса ERBB2/DARPin-miniSOG**

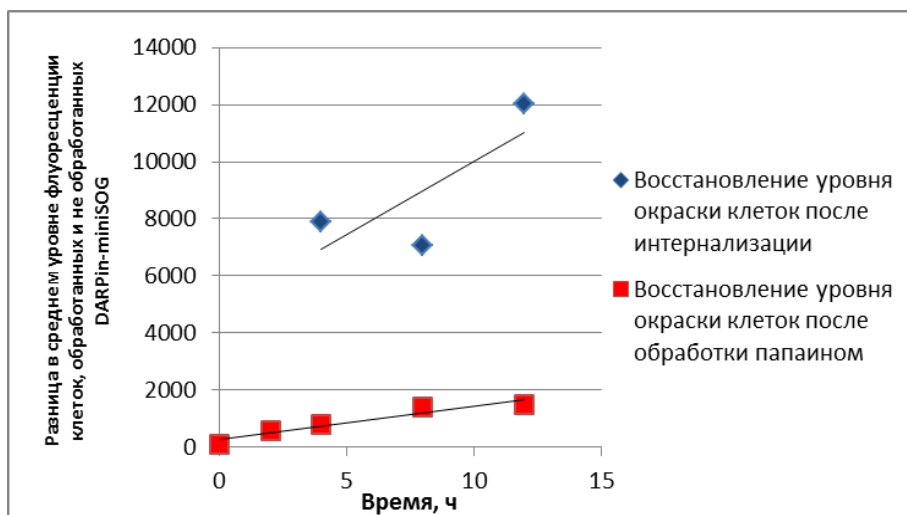
После обработки клеток SK-BR-3 папаином мы наблюдали снижение разницы флуоресцентного сигнала между окрашенными и неокрашенными клетками до уровня

погрешности измерения. На рисунке 19 отражены средние значения флуоресценции для неокрашенных клеток (синие столбцы) и клеток, повторно обработанных DARPIn-miniSOG (зелёные столбцы). В качестве контрольных приведены средние значения флуоресценции для клеток, не обработанных папаином.



**Рисунок 19.** Динамика среднего уровня флуоресценции клеток, обработанных папаином. Темно-зеленые столбики соответствуют флуоресценции клеток, предварительно окрашенных дарпином и интернализировавшим ERBB2, синие – флуоресценции клеток без предварительной обработки. Голубой и салатовый столбики – отрицательный (автофлуоресценция) и положительный (исходный уровень ERBB2) контроли. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение распределения флуоресценции.

Из полученных данных видно, что со временем уровень флуоресценции, а значит, количество заново синтезированного рецептора растет и за 72 часа восстанавливается до исходного уровня. При этом за 12 часов, которые потребовались, чтобы восстановить уровень флуоресценции после интернализации, в случае обработки папаином интенсивность флуоресценции практически не восстановилась и осталась практически на таком же уровне, как после протеолиза. Динамика восстановления рецептора после обработки клеток папаином показывает, что в случае опыта с интернализацией скорость восстановления интенсивности флуоресценции была выше, и, следовательно, основной вклад в восстановление количества ERBB2 после его интернализации, скорее всего, внесла рециклизация рецептора (Рисунок 20).



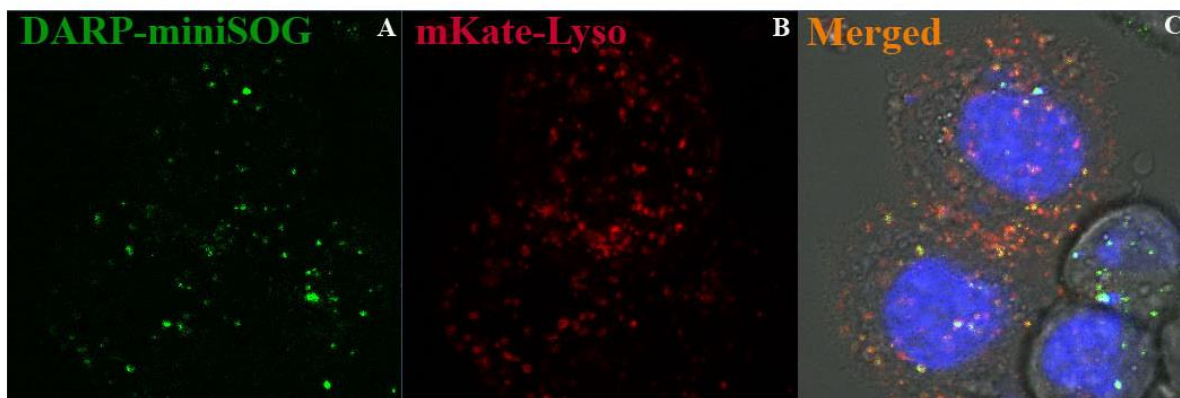
**Рисунок 20.** Динамика восстановления окраски клеток после интернализации (обозначено синим) и после обработки клеток папаином (обозначено красным). На график нанесены значения разности между средней флуоресценцией окрашенных и неокрашенных клеток

Из полученных данных можно заключить, что белок DARPin-miniSOG, связываясь с рецептором ERBB2 на поверхности клеток SK-BR-3, вызывает интернализацию рецептора, причем значительная его часть затем возвращается на мембрану путем медленной рециклизации.

### **3.3.7. Изучение интернализации белка DARPin-miniSOG в составе комплекса с рецептором ERBB2 и его колокализации с лизосомами с помощью конфокальной микроскопии**

Дополнительным доказательством способности DARPin-miniSOG интернализироваться в комплексе с рецептором ERBB2 стали данные, полученные с помощью конфокальной микроскопии, они же позволили проследить судьбу DARPin-miniSOG в клетке. Клетки SK-BR-3 трансфецировали плазмидой, кодирующей красный флуоресцентный белок mKate2-lyso, инкубировали с DARPin-miniSOG и оставляли в полной питательной среде на час при температуре +37°C. По прошествии этого времени флуоресценцию DARPin-miniSOG и mKate2-lyso визуализировали при помощи конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM-710-NLO. Работы на конфокальном микроскопе были выполнены к.ф.-м.н. А. В. Рябовой (институт общей физики им. Прохорова). Полученные микрофотографии приведены на рисунке 21 (А-С). Желтые участки соответствуют местам колокализации DARPin-miniSOG и mKate2. Для

количественного анализа колокализации полученные микрофотографии были обработаны при помощи программного обеспечения Carl Zeiss LSM-710-NLO. Коэффициенты колокализации рассчитывались как отношение совместно локализующихся пикселей в 1 или 2 каналах, соответствующих mKate2 и DARPin-miniSOG, к общему числу пикселей, имеющих уровень флуоресценции, выше уровня отсечения. Фракция DARPin-miniSOG, колокализирующаяся с лизосомами, составила 84%, доля сигнала от лизосом, колокализирующаяся с сигналом от DARPin-miniSOG, составила 36%.



**Рисунок 21.** Результаты исследования колокализации DARPin-miniSOG с лизосомами методом конфокальной микроскопии.

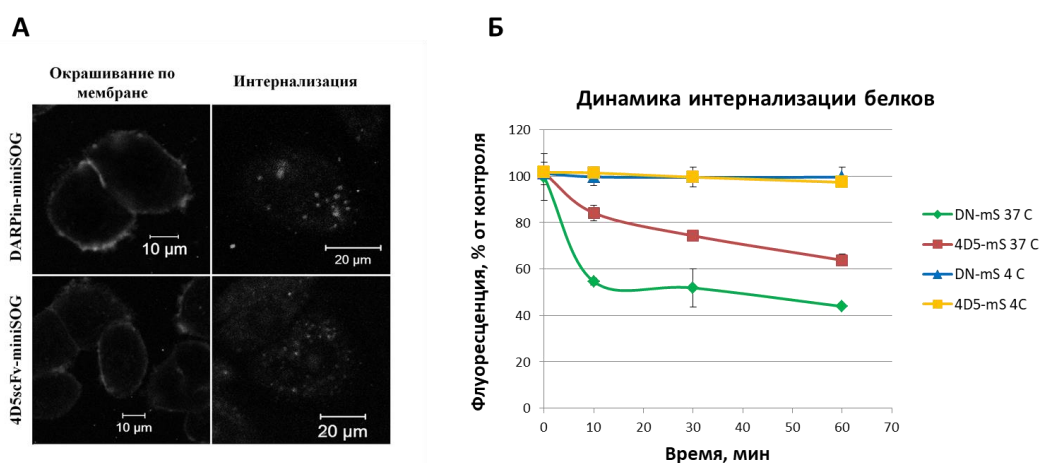
Таким образом, можно заключить, что после интернализации в комплексе с ERBB2 белок DARPin-miniSOG находится в лизосомах, где возможна его протеолитическая деградация.

### 3.3.8. Сравнение скорости интернализации DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG

Ранее в лаборатории молекулярной иммунологии был получен адресный белковый фототоксин 4D5scFv-miniSOG, содержащий в качестве адресного модуля одноцепочечный вариант антитела 4D5. Оба белка оказывали избирательное токсическое действие в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих клеток, однако их цитотоксичность отличалась в 5 раз:  $IC_{50}$  для 4D5scFv-miniSOG составляет 150 нМ [Mironova и др., 2013], в то время как  $IC_{50}$  DARPin-miniSOG составляет 0,8 мкМ [Proshkina и др., 2015]. Поскольку константы диссоциации фототоксинов и рецептора, определенные с помощью поверхностного плазмонного резонанса, имеют сравнимые значения, был сделан вывод о том, что решающее значение для эффективности работы данных фотосенсибилизаторов имеет скорость интернализации,



определяющая время нахождения токсина на мембране. Как видно из рисунка 22 А, оба белка эффективно взаимодействуют с ERBB2 на поверхности клеток SK-BR-3 и проникают внутрь клетки за счет интернализации в комплексе с рецептором. Изучение скорости интернализации адресных токсинов 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG проводили методом проточной цитометрии, как описано в п. 2.4. Как видно из рисунка 22 Б, двухкратное снижение уровня флуоресценции клеток SK-BR-3, обработанных DARPin-miniSOG, происходило за 10 минут, а клеток SK-BR-3, обработанных 4D5scFv-miniSOG, – за 30 минут, что указывает на более медленную интернализацию комплекса 4D5scFv-miniSOG/ERBB2 по сравнению с комплексом DARPin-miniSOG/ERBB2 [Шилова и др., 2017].



**Рисунок 22.** А. Взаимодействие токсинов 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG с ERBB2-положительными клетками SK-BR-3. Фотографии клеток сделаны с помощью лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM-710-NLO (Германия) в зеленом канале флуоресценции. Б. Динамика интернализации комплексов 4D5scFv-miniSOG/ERBB2 и DARPin-miniSOG/ERBB2.

Наибольший фототоксический эффект агентов на основе модуля miniSOG можно ожидать, если токсин находится в липидном бислое мембраны, поскольку ненасыщенные жирные кислоты, содержащиеся в большом количестве в плазматической мембране, являются главной мишенью активных форм кислорода [Girotti, 2001]. Дополнительным фактором, вносящим вклад в фотоиндуцированное повреждение липидов, является наличие молекулярного кислорода, который хорошо растворим в липидах. Как следствие, в липидном окружении фототоксин miniSOG имеет больше шансов, чем в водном, встретиться с молекулярным кислородом и выработать активные формы кислорода, вызывающие разрушение клетки. Поскольку преимущественным механизмом гибели клеток, облученных в присутствии данных фототоксинов, является некроз, повреждение мембраны вносит решающий вклад в токсичность адресных белков. Таким образом, именно различием в скорости интернализации

объясняется различие в цитотоксичности 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG в отношении ERBB2-положительных клеток.

### 3.3.9. Установление механизма гашения miniSOG в эндосомах

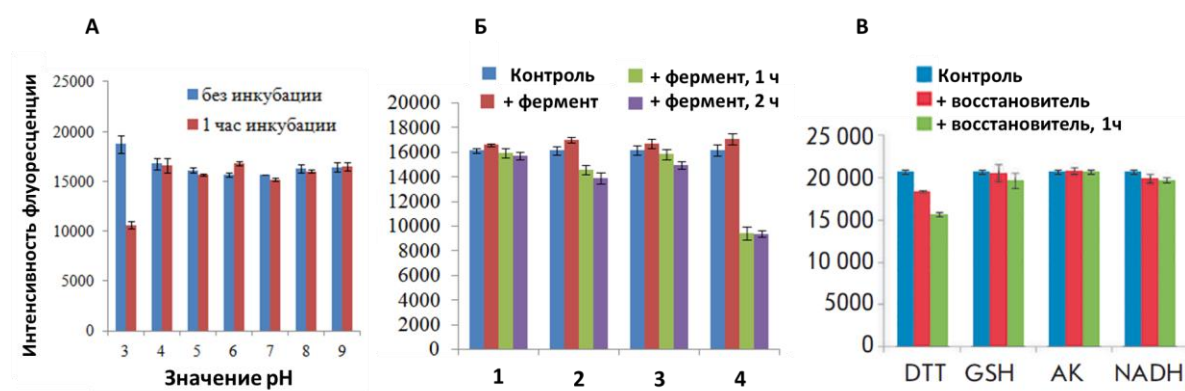
Изменение флуоресцентного сигнала miniSOG делает этот модуль удобным инструментом для изучения динамики интернализации, однако важно понимать причины этого явления, так как флуоресцентные свойства miniSOG неразрывно связаны с его токсическими свойствами, и физико-химические процессы, происходящие с ним в различных компартментах клетки, должны учитываться при разработке систем доставки фототоксина к терапевтическим мишеням. Механизм снижения интенсивности флуоресценции miniSOG при попадании в клетку до сих пор не был установлен, и, исходя из процессов, происходящих в эндосоме, можно сформулировать несколько гипотез, объясняющих данное явление.

Для некоторых флуорофоров угасание в эндосоме может быть связано с протонированием при понижении pH. Так, флуоресцеинизотиоцианат (FITC) реагирует на изменение кислотности и используется для изучения интернализации клеточных рецепторов [Brabec и др., 2005]. Основой хромофора miniSOG является флавиномононуклеотид (FMN), который также способен подвергаться протонированию, что могло бы служить причиной падения интенсивности флуоресценции [Brabec и др., 2005; Jin и др., 2010]. Протеолиз в эндосоме или лизосоме является менее вероятной причиной этого явления, так как флуоресцентные свойства белка miniSOG определяются его кофактором. Наконец, угасание фототоксинов может быть следствием экранирования miniSOG и поглощения его флуоресценции хромофорами цитоплазмы.

Из полученных результатов следует, что закисление pH при попадании комплекса рецептор–белок в эндосомы и лизосомы не объясняет этого явления, так как достоверное и значительное снижение флуоресцентного сигнала (более чем в 2 раза) наблюдалось при pH 3, но не выше (Рисунок 23 А). В то же время известно [Geisow, Evans, 1984], что в минимальное значение pH в эндосомах и лизосомах составляет 4,8. Как и предполагалось, протеолиз также не оказал существенного влияния на флуоресценцию DARPin-miniSOG. Были использованы ферменты с различной специфичностью: трипсин, папаин, химотрипсин, подобный эндосомному катепсину G [Thomas и др., 2014], и пепсин, соответствующий по активности катепсинам D и E лизосом [Stoka, Turk, Turk, 2016], при оптимальных для них значениях pH. Значительное падение интенсивности сигнала флуоресценции DARPin-miniSOG наблюдалось

только при обработке белка пепсином, однако в данном случае причиной тушения флуоресценции являлось низкое значение pH (Рисунок 23 Б). Эта гипотеза подтверждается и тем, что падение флуоресценции произошло и в реакционной смеси, содержащей вместо белковых фототоксинов FMN, не чувствительный к протеолизу. Полное расщепление DARPin-miniSOG и 4D5scFvminiSOG в экспериментальных условиях было подтверждено при помощи электрофореза в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях через 1 ч инкубации фототоксинов с протеолитическими ферментами.

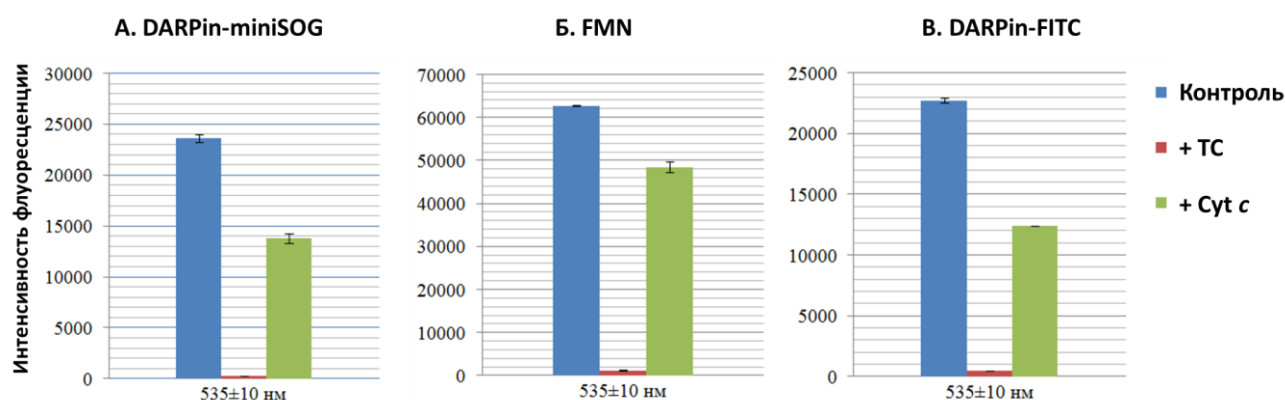
Еще одной причиной падения интенсивности флуоресценции miniSOG при рецептор-опосредованной интернализации могло быть восстановление кофактора реакционноспособными молекулами клетки. Известно, что интенсивность флуоресценции FMN падает при его восстановлении [Benson и др., 1979]. В норме miniSOG содержит восстановленный FMN, однако если при наработке miniSOG в бактериях в белок включается заметная доля окисленной формы FMN или он легко окисляется при хранении, то восстановление могло бы объяснять угасание флуорофора в эндосоме. Было исследовано изменение флуоресценции DARPin-miniSOG при инкубации с дитиотреитолом, глутатионом (восстановленная форма, GSH), аскорбиновой кислотой, никотинамидаденинуклеотидом (NADH), борогидридом натрия ( $\text{NaBH}_4$ ), в качестве контроля использовался свободный FMN в отсутствие белковой составляющей. Восстановление кофактора флавиномононуклеотида в составе DARPin-miniSOG происходило только при повышенных концентрациях  $\text{NaBH}_4$  (от 10 мМ), но не в присутствии других более физиологически релевантных восстановителей (Рис. 23 В), что говорит о том, что восстановление кофактора не играет значимой роли в изменении интенсивности флуоресценции miniSOG в клетке по причине экранирования флавина белком и защиты от доступа восстановителей.



**Рисунок 23.** Изменение интенсивности флуоресценции DARPin-miniSOG в различных условиях. А. Зависимость интенсивности флуоресценции DARPin-miniSOG от pH среды. Б.

Флуоресценция DARPin-miniSOG в условиях обработки протеазами, протеолиз проводился при значениях pH, оптимальных для данных ферментов. 1 – трипсин, 2 – химотрипсин, 3 – папин, 4 – пепсин. В. Зависимость интенсивности флуоресценции от присутствия внутриклеточных восстановителей. DTT – дитиотреитол, GSH – восстановленный глутатион, АК – аскорбиновая кислота, NADH – никотинамидадениндинуклеотид.

В качестве еще одной гипотезы, объясняющей снижение интенсивности флуоресценции miniSOG в клетке, рассматривалось экранирование флуорофора цитоплазмой и поглощение флуоресценции хромофорами клетки. В качестве модельной молекулы, способной поглощать флуоресценцию miniSOG *in vitro*, был протестирован краситель трипановый синий, который способствовал полному гашению флуоресцентного сигнала как DARPin-miniSOG, так и FMN (Рисунок 24 А, Б). Нативными перехватчиками излучения miniSOG внутри клетки могут быть гемопротеины, такие, как цитохром *c*. Показано, что при возбуждении флуоресценции в присутствии цитохрома как в случае FMN, так и в случае фототоксина происходит падение флуоресцентного сигнала примерно в 2 раза, при этом DARPin, конъюгированный с FITC, стандартным флуоресцентным красителем, показал сходный результат (Рисунок 24 В) [Кузичкина, Шилова, Деев, 2018].

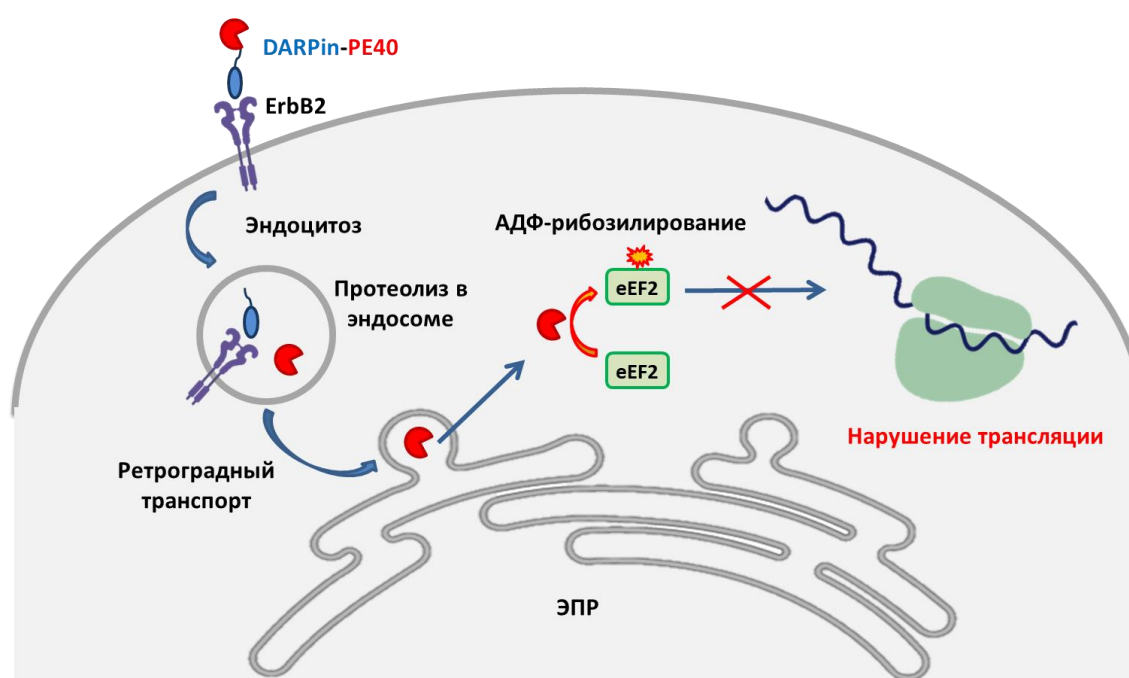


**Рисунок 24.** Изменение интенсивности флуоресценции DARPin-miniSOG, FMN и DARPin-FITC в присутствии других флуорофоров. ТС – трипановый синий, Cyt *c* – цитохром *c*.

Таким образом, поскольку пептидная часть флавопротеина miniSOG не важна для флуоресценции флавина, который при этом хорошо защищен от клеточных восстановительных эквивалентов, основной причиной снижения флуоресценции интернализированного белка является его экранирование молекулами-гасителями в цитоплазме. В целом, благодаря спектральным свойствам miniSOG белки на его основе могут использоваться для изучения динамики интернализации клеточных рецепторов, как было показано в данной работе для DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG.

### 3.4. Противораковая активность белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE *in vitro*

Изучение интернализации белка DARPin-miniSOG показало, что модуль DARPin 9-29 способен эффективно вызывать эндоцитоз рецептора ERBB2. Эта особенность делает DARPin 9-29 перспективным компонентом терапевтических агентов, требующих попадания в эндосому, таких как экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa*. Природный токсин имеет адресный домен, связывающийся с рецептором-мишенью на поверхности клетки и вызывающий его интернализацию, мотивы для внутриклеточного транспорта и каталитический домен, осуществляющий АДФ-рибозилирование эукариотического фактора элонгации 2, приводящее к нарушению синтеза белка и гибели клетки. Модульная структура этого белка позволяет использовать его укороченные варианты и заменять исходный адресный домен на другие молекулы, доставляя токсин к раковым клеткам. При этом агенту достаточно проникнуть в эндосому, где эффекторный модуль отрезается эндосомальной протеазой, после чего токсин при помощи сигнала ретроградного транспорта KDEL транспортируется в эндоплазматический ретикулум, откуда высвобождается в цитозоль [Weldon, Pastan, 2011] (Рисунок 25).



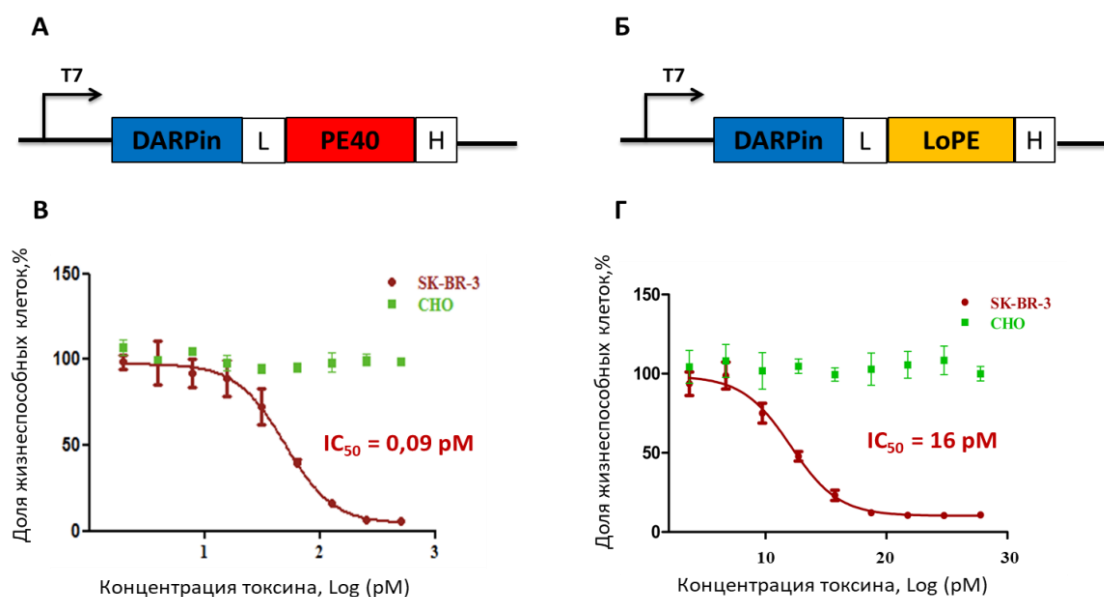
**Рисунок 25.** Механизм работы противоракового агента на основе экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* на примере белка DARPin-PE40. eEF2 – эукариотический фактор элонгации 2.

Были протестированы два варианта рекомбинантных белков: DARPin-PE40, содержащий в качестве токсического модуля фрагмент экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* массой 40 кДа,

и DARPin-LoPE, содержащий фрагмент экзотоксина со сниженной иммуногенностью (схемы конструкций представлены на рисунке 26 А, Б). Белки были наработаны в цитоплазме *E. coli* и очищены никель-аффинной и ионообменной хроматографией, перед введением в животных белки дополнительно очищали от липополисахарида на полимиксине В. Выход чистого белка составил 75 мг с 1 литра жидкой культуры для DARPin-PE40 и 30 мг с 1 литра жидкой культуры для DARPin-LoPE.

### 3.4.1. Токсичность белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE *in vitro*

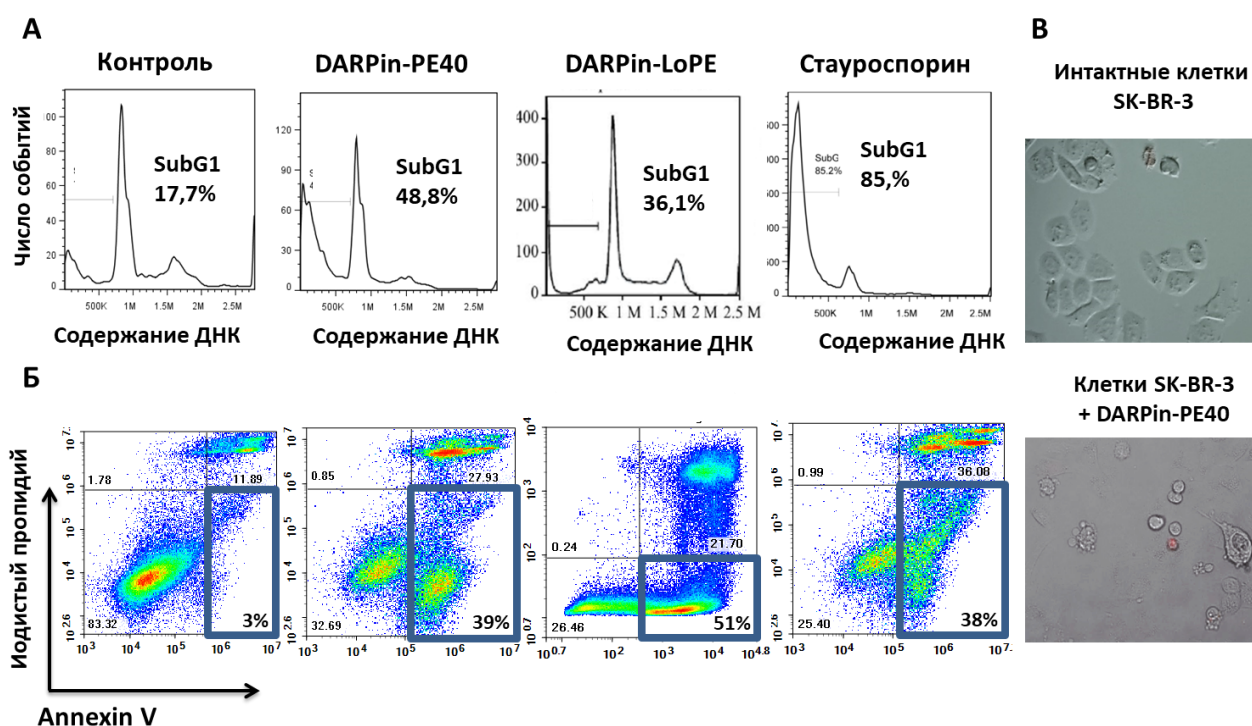
Оба белка показали высокую специфическую активность в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих клеток *in vitro* (Рисунок 26 В, Г). Токсичность оценивали методом МТТ-теста: клетки инкубировали в полной питательной среде с добавлением адресных токсинов в течение 72 часов, после чего проводили измерение. Токсичность белков оценивали по  $IC_{50}$ , концентрации белка в среде, при которой жизнеспособность клеток составляла 50% от контроля. Для клеток SK-BR-3  $IC_{50}$  составила 0,09 пМ для DARPin-PE40 и 16 пМ для DARPin-LoPE.



**Рисунок 26.** А. Схема генетической конструкции DARPin-PE40: T7 – промотор РНК-полимеразы фага T7, DARPin – DARPin\_9-29, L – гибкий линкер из шарнирного региона тяжелой цепи иммуноглобулина IgG3 мыши (EFPKPSTPPGSSGGAP), PE40 – фрагмент экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* массой 40 кДа, H – гексагистидиновая последовательность для очистки белка. Б. Схема генетической конструкции DARPin-LoPE: L – укороченный линкер с пониженной иммуногенностью, LoPE – фрагмент экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* со сниженной иммуногенностью. В, Г. Токсичность DARPin-PE40 и DARPin-LoPE в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих клеток SK-BR-3, измеренная методом МТТ: SK-BR-3 – клетки аденокарциномы молочной железы, CHO – клетки яичника китайского хомячка.

### 3.4.2. Механизм клеточной гибели

Интернализация белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE и их ретроградный транспорт в эндоплазматический ретикулум были подтверждены конфокальной микроскопией [Sokolova и др., 2016; Прошкина и др., 2017]. Ожидаемым механизмом клеточной гибели при воздействии псевдомонадного экзотоксина являлся апоптоз, для обоих белков был подтвержден именно этот путь. На апоптоз указывали фрагментация ДНК (Рисунок 27 А) и ранняя экспозиция фосфатидилсерина на плазматической мембране (Рисунок 27 Б), определенные при помощи проточной цитофлуориметрии. Морфология клеток также соответствовала апоптозу: клетки уменьшались в размере и фрагментировались на апоптотические тельца, позже наблюдался вторичный некроз (Рисунок 27 В).



**Рисунок 27.** Гибель клеток, обработанных белками на основе псевдомонадного экзотоксина, происходит преимущественно по механизму апоптоза. **А.** Доля клеток и постклеточных элементов с гиподиплоидным содержанием ДНК. Контроль – клетки SK-BR-3, проинкубированные в среде без адресных токсинов, DARPin-PE40 – клетки SK-BR-3, проинкубированные с 10 нМ DARPin-PE40, DARPin-LoPE – клетки SK-BR-3, проинкубированные с 50 нМ DARPin-LoPE. В качестве положительного контроля апоптоза использованы клетки SK-BR-3, проинкубированные в среде с 5 мкМ стауроспорина **Б.** Двойное окрашивание клеток аннексином V, конъюгированным с FITC и иодистым пропидием. **В.** Морфология клеток, наложение проходящего света и флуоресценции иодистого пропидия.

С точки зрения терапии апоптоз или аутофагия являются более предпочтительными путями гибели раковых клеток, чем некроз, так как некроз вызывает воспаление в тканях, а остатки некротизированных клеток влияют на выжившие раковые клетки и компоненты опухолевой стромы, усиливая ангиогенез и стимулируя миграционную активность раковых клеток [Karsch-Bluman и др., 2019]. Апоптоз же является физиологическим механизмом поддержания гомеостаза тканей, который в норме не индуцирует воспаление, поскольку цитоплазма погибающих клеток долгое время остается заключенной в неповрежденную цитоплазматическую мембрану, а апоптотические тельца эффективно поглощаются макрофагами [Galluzzi и др., 2018]. Однако одним из базовых свойств малигнизированных клеток является в той или иной мере выраженная устойчивость к индукции апоптоза, позволяющая раковым клеткам игнорировать такие внутренние сигналы, как генотоксический стресс, окислительный стресс и другие и выживать вопреки терапии [Hanahan, Weinberg, 2000; Hanahan, Weinberg, 2011]. Производные псевдомонадного экзотоксина А позволяют обойти эту устойчивость, так как воздействуют на самую основу анаболизма, роста и регуляции работы клетки – синтез белка. То, что в результате клетки погибают именно по механизму апоптоза, делает белки DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE перспективными агентами для терапии ERBB2-гиперэкспрессирующих опухолей.

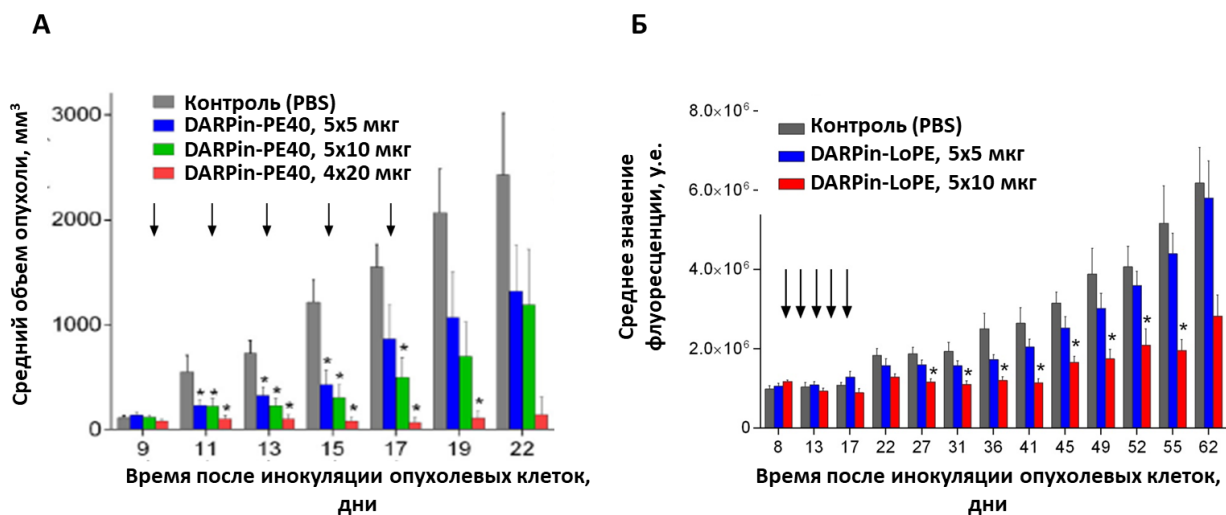
### **3.5. Оценка эффективности DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE на ксенографтных моделях рака**

Способность белков DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE подавлять рост раковых клеток была проверена *in vivo* на ксенографтных моделях опухолей, привитых бестимусным мышам линии BALB/c nude. Работа по оценке противораковой эффективности данных токсинов была проведена в Лаборатории оптической тераностики Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета имени Н.И. Лобачевского.

Противораковую активность DARPIn-PE40 тестировали на бестимусных мышах линии BALB/c nude с подкожно привитыми клетками аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, объем опухоли оценивали по длине и ширине опухолевого узла. Белок вводили внутривенно через день 5 дозами по 5 или 10 мкг (25 и 50 мкг за курс соответственно) либо 4 дозами по 20 мкг (80 мкг за курс). При использовании всех режимов лечения динамика роста опухоли достоверно отличалась от контроля, причем в группе мышей, получивших суммарно 80 мкг DARPIn-PE40 белка за курс, эффект был наибольшим, и рост опухоли не ускорялся после прекращения введения белка [Sokolova и др., 2016].



Оценку эффективности адресного токсина DARPin-LoPE проводили на флуоресцентной ксенографтной модели диссеминированной аденокарциномы яичника человека. Для этого бестимусным мышам линии BALB/c интраперитонеально вводили клетки линии SKOVip-kat. Эта линия была получена путем трансфекции клеток линии SKOV3.ip1 геном дальнекрасного флуоресцентного белка Katushka [Shcherbo и др., 2007]. Родительская линия SKOV3.ip1 формирует диссеминирующую опухоль в иммунодефицитных мышах при введении клеток внутривентриально, а также гиперэкспрессирует рецептор ERBB2 [Yu и др., 1993]. Данная модель считается клинически релевантной, поскольку рак яичника, в отличие от гематогенно распространяющихся опухолей, исходно распространяется в перитонеальной полости, разрастаясь вдоль мезотелия и прорастая в ткани или расселяясь отдельными клетками и сфероидными с током перитонеальной жидкости [Lengyel, 2010]. В течение недели после внутривентриального введения клеток SKOVip-kat у бестимусных мышей в брюшной полости формировались множественные флуоресцирующие опухолевые узлы, которые были визуализированы прижизненно неинвазивным методом поверхностного флуоресцентного имиджинга [Zdobnova и др., 2015]. Поскольку для интраперитонеальных метастаз предпочтительно введение противораковых препаратов внутривентриально, адресный токсин DARPin-LoPE вводили животным внутривентриально пятикратно на 9, 11, 13, 15 и 17 дни после инъекции опухолевых клеток, в общей дозе «5×5 мкг» (25 мкг за курс) и «5×10 мкг» (50 мкг за курс). Прижизненная визуализация флуоресцирующих опухолей SKOVip-kat показала значимое замедление развития опухолевых узлов в брюшной полости животных, которым вводился адресный токсин DARPin-LoPE в дозе «5 × 10 мкг» (50 мкг за курс), по сравнению с контролем. При этом адресный токсин в дозе «5×5 мкг» (25 мкг/животное) оказывал слабо выраженный эффект на рост экспериментальной опухоли. Статистически достоверные отличия от контроля в интегральной интенсивности флуоресценции брюшной полости мышей, получивших суммарно 50 мкг белка, наблюдались уже через 10 дней после последней инъекции DARPin-LoPE и далее сохранялись в течение месяца (Рисунок 28).



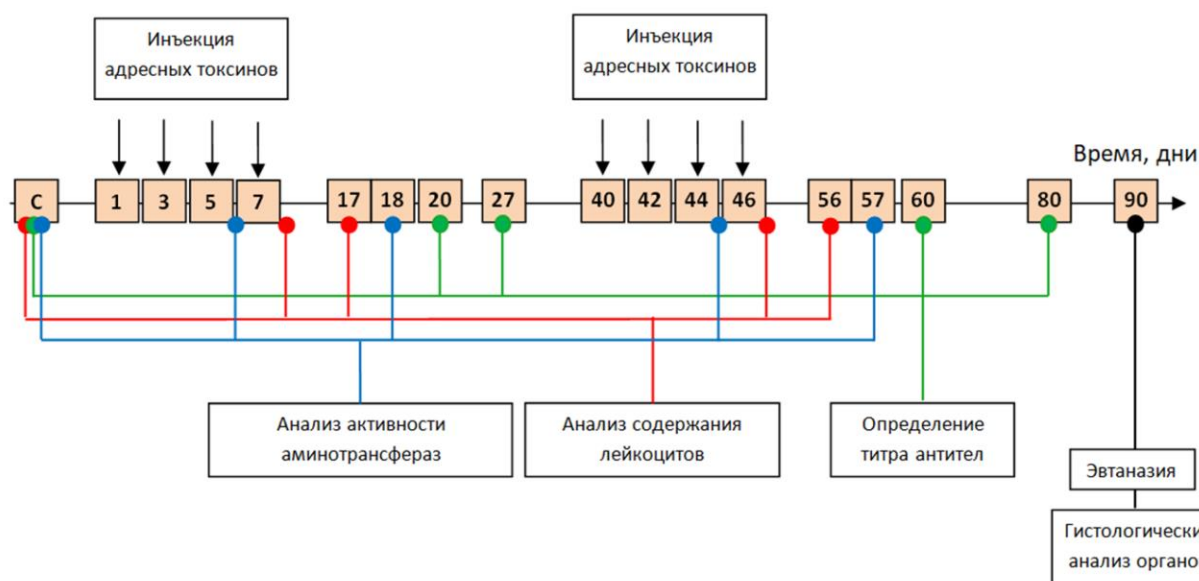
**Рисунок 28. Противораковая активность белков на основе ETA *in vivo*. А.** Рост подкожных ксенографтов рака молочной железы на фоне введения DARPin-PE40. Дни инъекций отмечены стрелками. **Б.** Рост интраперионеальных ксенографтов рака яичника на фоне введения DARPin-LoPE. Дни инъекций отмечены стрелками.

Стоит отдельно отметить, что стандартная терапия карциномы яичника, как правило, включает в себя хирургическое удаление опухоли и последующую химиотерапию препаратами платины или таксаном [Armstrong и др., 2006]. Однако для рака яичника характерна лишь временная чувствительность к химиотерапии, из-за чего вероятность успешного излечения составляет лишь 30%. Кроме того, при данном заболевании развиваются множественные диссеминированные в перитонеальной полости метастазы, которые и представляют основную причину быстрой прогрессии заболевания и высокой смертности [Lengyel, 2010]. Показанная эффективность адресного токсина DARPin-LoPE именно в отношении интраперионеальных метастазов, смоделированных в данной работе, является значимым результатом с точки зрения терапевтического применения данного агента.

### 3.6. Токсичность и иммуногенность адресных токсинов DARPin-LoPE и DARPin-PE40

Токсичность и иммуногенность DARPin-LoPE оценивали в сравнении с DARPin-PE40. Эти белки вводили здоровым иммунокомпетентным мышам линии BALB/c двумя курсами по 4 инъекции через день (рисунок 28). DARPin-PE40 вводили в дозировке 10 мкг на инъекцию («4x10», 40 мкг за курс), DARPin-LoPE вводили по 10 мкг на инъекцию («4x10», 40 мкг за курс) или по 20 мкг на инъекцию («4x20», 80 мкг за курс). Состояние животных оценивали по весу тела, внешнему виду и подвижности, в крови отслеживали соотношение лимфоцитов и гранулоцитов на 8 и 17 день после начала каждого курса, и активность

аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови на 6 и 18 дни после начала каждого курса. Иммуногенность адресных токсинов оценивали по титру антител, специфичных к исследуемому белку, спустя две и три недели с момента окончания первого курса инъекций и спустя две и пять недель с момента окончания второго курса инъекций. В конце эксперимента животных эвтаназировали и проводили гистологическое исследование внутренних органов. Схема, отражающая время экспериментальных воздействий и анализов, приведена на рисунке 29.

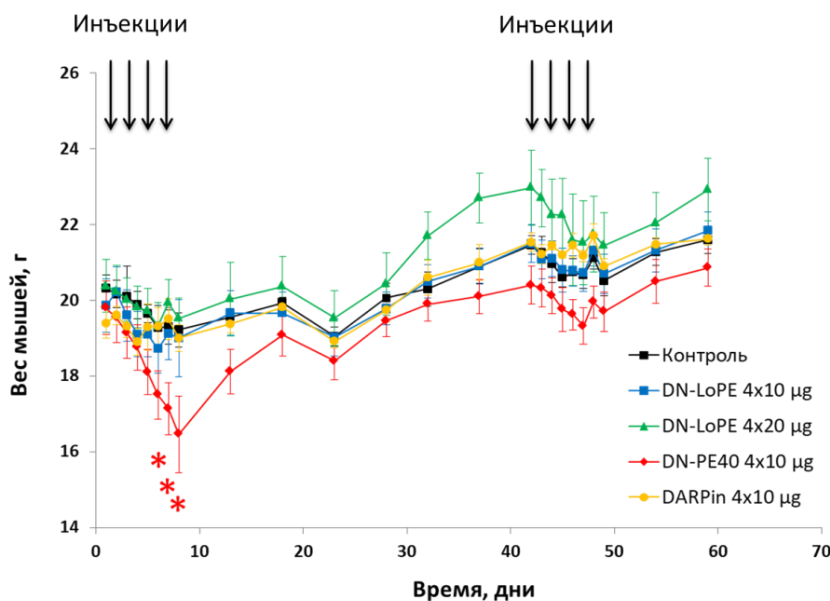


**Рисунок 29. Схема исследования токсичности и иммуногенности адресного токсина DARPin-LoPE.** Буквой «С» обозначен анализ исследуемых параметров у животных до начала курса инъекций адресных токсинов. За день «1» принят день первой инъекции адресных токсинов. Инъекции адресных токсинов проводили двумя курсами по четыре инъекции через день, с перерывом в месяц между курсами, т.е. на 1, 3, 5, 7 (первый курс) и 40, 42, 44 и 46 (второй курс) дни эксперимента. Исследование лейкоцитов методом проточной цитофлуориметрии проводилось на 8 и 17 дни с начала каждого курса инъекций (т.е. на 8, 17, 47 и 56 дни эксперимента – отмечено красным). Измерение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови проводили на 6 и 18 дни с момента начала каждого курса инъекций (т.е. на 6, 18, 45 и 57 дни эксперимента – отмечено синим). Титр специфических антител в сыворотке крови анализировали спустя две и три недели с момента окончания первого курса инъекций и спустя две и пять недель с момента окончания второго курса инъекций (т.е. на 20, 27, 60 и 80 дни эксперимента – отмечено зеленым). Эвтаназию животных и забор образцов для гистологического исследования проводили на 90 день эксперимента (отмечено черным).

### 3.6.1. Исследование общей токсичности DARPin-PE40 и DARPin-LoPE

Состояние животных оценивали по весу тела, внешнему виду и подвижности. Первый курс инъекций адресного токсина DARPin-PE40 в дозе «4x10» мкг (40 мкг за курс) приводил к

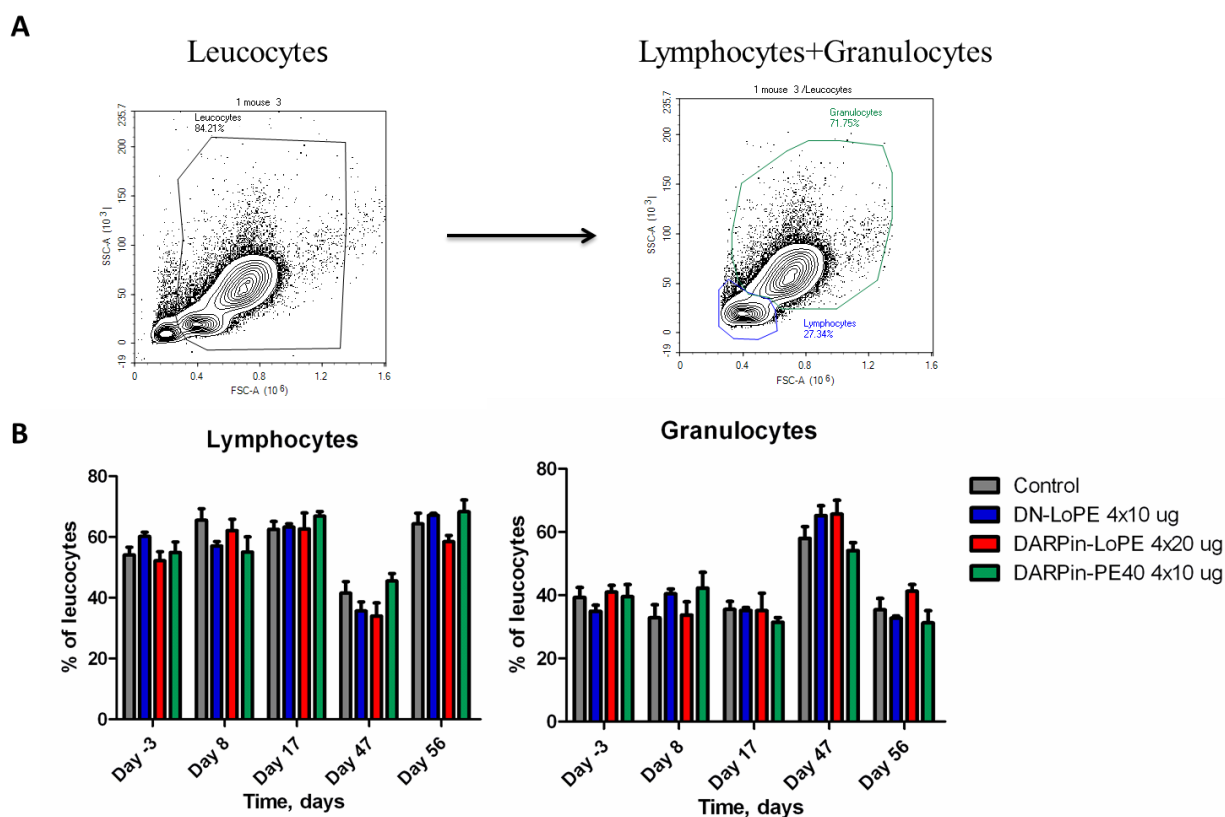
значительному снижению веса животных по сравнению с контрольной группой и мышами, получавшими адресный токсин DARPin-LoPE как в той же дозе («4x10» мкг), так и в дозе, вдвое большей («4x20» мкг) (Рисунок 30). Кроме снижения веса, у мышей из этой группы к 6-8 дню после начала курса ухудшалось состояние шерсти и наблюдалось снижение двигательной активности. Вес тела животных из групп, получавших DARPin-LoPE, не показал значимых отличий от контрольной группы. После второго курса инъекций ни одна из экспериментальных групп не показала значимых отличий от контрольной, что может быть связано с выработкой нейтрализующих антител, подавляющих токсическое действие DARPin-PE40.



**Рисунок 30.** Динамика веса тела мышей (среднее± ошибка среднего). Дни инъекций обозначены стрелками. Контроль – мыши, получавшие инъекции фосфатно-солевого буфера, контрольная группа; DARPin-LoPE 4×10 µg – мыши, получавшие инъекции по 10 мкг DARPin-LoPE (40 мкг на курс, 80 мкг суммарно); DARPin-LoPE 4×20 µg – мыши, получавшие инъекции по 20 мкг DARPin-LoPE (80 мкг на курс, 160 мкг суммарно); DARPin-PE40 4×10 µg – мыши, получавшие инъекции по 10 мкг DARPin-PE40 (40 мкг на курс, 80 мкг суммарно), DARPin 4×10 µg – мыши, получавшие инъекции по 10 мкг DARPin 9-29 (40 мкг на курс, 80 мкг суммарно). Данные отражают средние значения по группам ±ошибка среднего. Звездочками отмечены достоверные отличия от контрольной группы при  $p < 0.05$ .

Для оценки признаков возможного острого воспаления были исследованы лейкоциты методом проточной цитофлуориметрии. Анализ лейкоцитов сразу и спустя 10 дней после окончания каждого курса инъекций не выявил значимых изменений в соотношении гранулоцитов и лимфоцитов в группах животных, получавших DARPin-PE40 и DARPin-LoPE, по сравнению с контрольной группой. Доля гранулоцитов у всех животных в конце курса

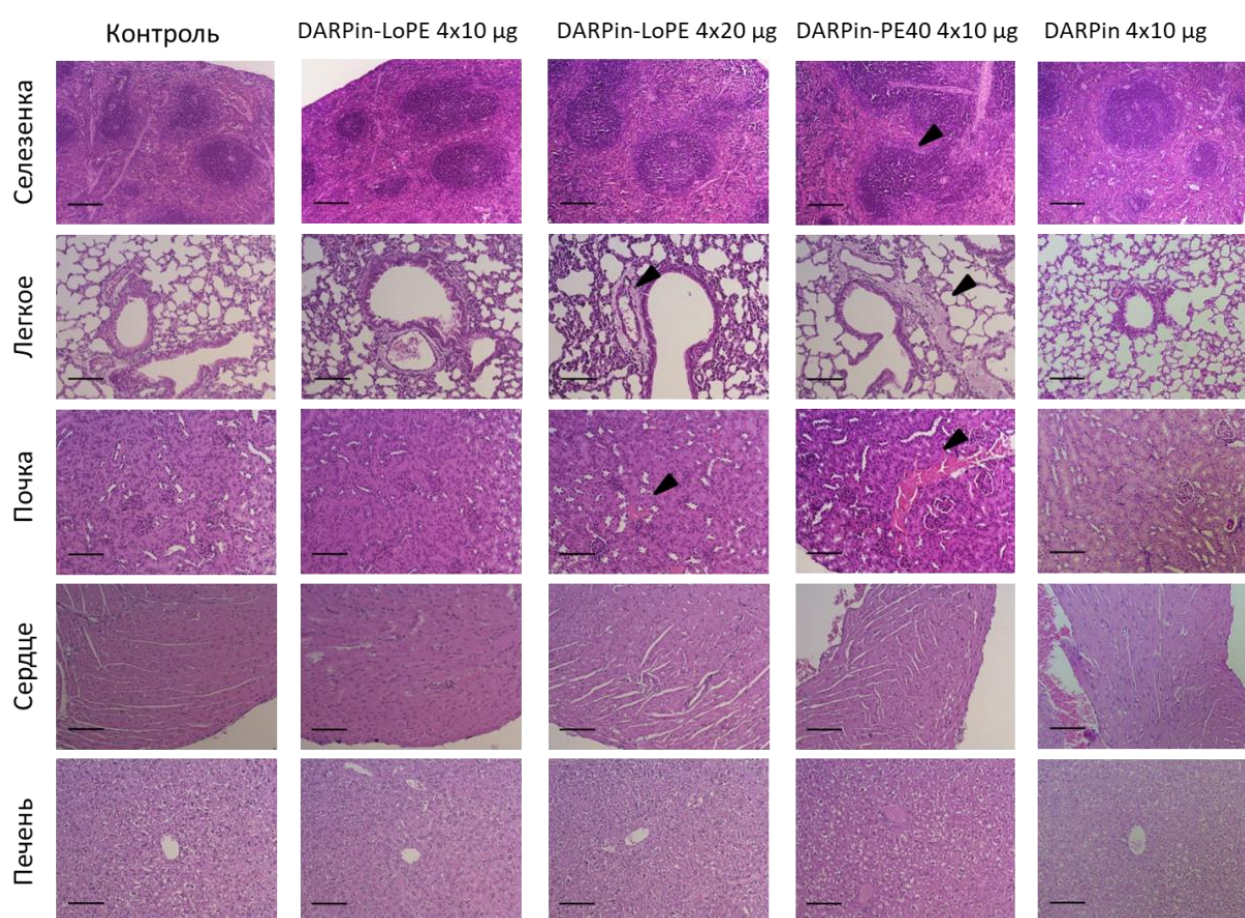
инъекций и спустя 10 дней после его окончания изменяется незначительно, что свидетельствует об отсутствии острого воспаления (Рисунок 31).



**Рисунок 31.** Анализ лейкоцитов в крови мышей методом проточной цитометрии. А – стратегия гейтирования. В – доля лимфоцитов и гранулоцитов в общей популяции лейкоцитов до начала инъекций (Day-3), в конце каждого курса введения (Day 8 и Day 47) и через 10 дней после окончания каждого курса инъекций (Day 17 и Day 56). Control – мыши, получавшие инъекции фосфатно-солевого буфера, контрольная группа.

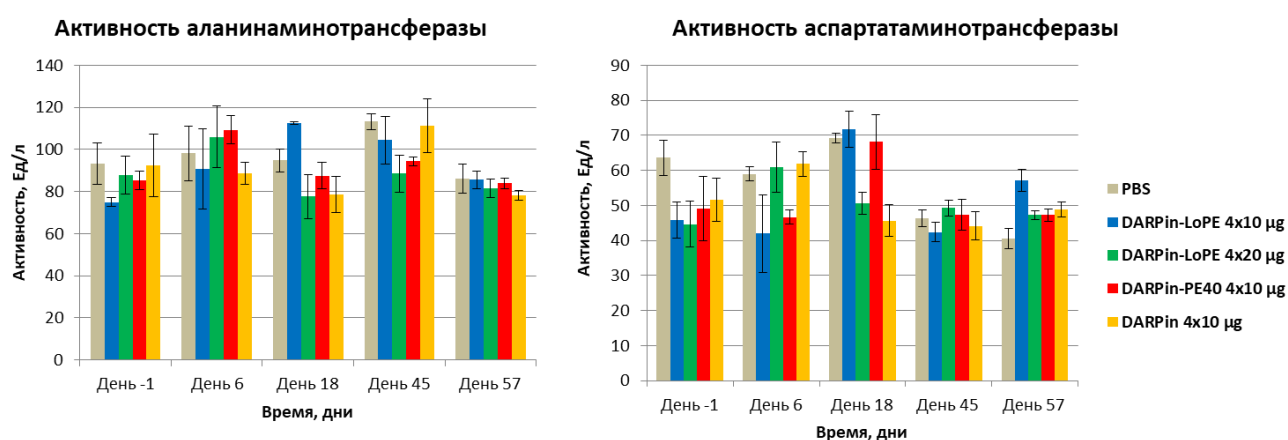
Токсичность адресных агентов была также оценена на основе патоморфологического анализа органов *post mortem*. Было показано, что селезенка у мышей, получавших два курса инъекций DARPin-LoPE в обеих дозировках (по «4x10» мкг и по «4x20» мкг за курс), не отличалась от контроля. Однако, в случае мышей, получавших инъекции DARPin-PE40 в той же дозе («4x10» мкг за курс), в селезенке наблюдались изменения белой пульпы: умеренная гиперплазия белой пульпы как в виде отдельных фолликулов, так и в зоне периартериальных муфт, что свидетельствует о более сильном иммунном ответе (Рисунок 32). В легких мышей, получавших «4x10» мкг DARPin-PE40 за курс, наблюдалось небольшое расширение перибронховаскулярного пространства. Это может быть связано с повышенной проницаемостью кровеносных сосудов, которая была ранее описана в качестве побочного

эффекта при применении белкового токсина на основе PE40 [Li, Zhang, 2006]. Белок DARPIn-LoPE вызывал аналогичный эффект лишь в дозе, вдвое большей («4x20» мкг за курс). В почках мышей, получавших «4x10» мкг DARPIn-PE40 за курс, были обнаружены значительные очаги кровоизлияния и некроза в корковом и мозговом веществе, а также наблюдалось неравномерное кровенаполнение в мозговом веществе. При этом адресный токсин DARPIn-LoPE в той же дозе не повлиял на морфологию почек животных. Деструктивные изменения почек были выявлены только у животных, получавших DARPIn-LoPE в удвоенной дозе («4x20» мкг за курс), однако они были менее выражены (наблюдались мелкие кровоизлияния в корковом веществе). Патоморфологическое исследование печени и сердца не выявило макроскопических и микроскопических изменений у мышей, получавших оба адресных токсина (Рисунок 32).



**Рисунок 32. Гистологическое исследование органов мышей, окраска гематоксилином и эозином.** Патологические изменения выделены стрелками. У мышей, получавших 4×10 мкг DARPIn-PE40 за курс доля белой пульпы в зоне периартериальных муфт селезенки увеличена, что указывает на более сильный иммунный ответ. В легких мышей, получавших 4×10 мкг DARPIn-PE40 и 4×20 мкг DARPIn-LoPE перибронховаскулярное пространство было расширено, в почках наблюдались кровотечения и очаги некроза. Масштабный отрезок соответствует 200 мкм в случае селезенки и 100 мкм для остальных органов.

Для подтверждения уровней токсичности измеряли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови – ферментов, работающих в печени (АЛТ) или также в сердце и скелетных мышцах (АСТ). В норме их активность в сыворотке крови очень низка, однако она повышается при разрушении гепатоцитов и кардиомиоцитов и может указывать на повреждения внутренних органов. Активность ферментов АЛТ и АСТ измеряли на 6 и 18 дни после начала каждого курса: значения для мышей, получавших DARPin-LoPE и DARPin-PE40, не имели значимых отличий как между собой, так и по сравнению с контрольной группой, демонстрируя значения в рамках физиологической нормы (Рисунок 33).



**Рисунок 33. Активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови мышей до начала инъекций (День -1), на 6 и 18 дни после начала каждого курса инъекций (т.е., на дни 6, 18, 45 и 57 эксперимента).**

Таким образом, ни DARPin-PE40, ни DARPin-LoPE не проявили выраженной кардиотоксичности и гепатотоксичности. DARPin-PE40 привел к изменениям в иммунном компартменте селезенки, что согласуется с предположением о его повышенной иммуногенности. Как DARPin-PE40, так и DARPin-LoPE вызвали изменения в легких и почках, однако токсический эффект при введении DARPin-PE40 был выше, чем при введении такой же или вдвое большей дозы DARPin-LoPE.

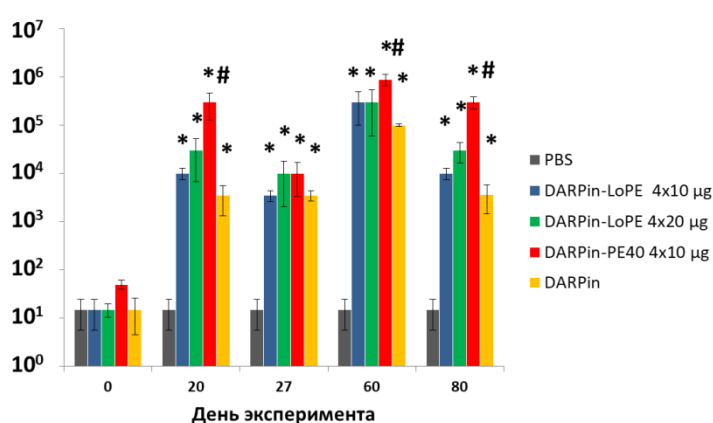
### 3.6.2. Исследование иммуногенности DARPin-PE40 и DARPin-LoPE40

Иммуногенность белков оценивали по титру специфических антител в сыворотке мышей (Рисунок 34). На 20 день после начала первого курса инъекций достоверное увеличение

значительное увеличение титра антител по сравнению с группой мышей, получавших PBS, наблюдается во всех экспериментальных группах. Титр антител к DARPin-LoPE составил 1:10 000 в группе мышей, получавших 4x10 мкг DARPin-LoPE и 1:30 000 в группе мышей, получавших 4x20 мкг DARPin-LoPE. Самое значительное увеличение титра антител наблюдалось в группе мышей, получавших 4x10 мкг DARPin-PE40, его значение достигло 1:300000.

На 27 день титр антител во всех группах животных, получавших белки, падает, достигая значений 1:3500 для группы DARPin-LoPE 4x10 мкг и 1:10 000 для DARPin-LoPE 4x20 мкг и DARPin-PE40 4x10 мкг. На 20 день после начала второго курса инъекций (день 60) титр антител существенно возрастает во всех опытных группах, по сравнению с мышами, которые получали PBS. У мышей, получавших DARPin-LoPE в обеих дозах, он составил 1:300 000, у мышей, получавших 4x10 мкг DARPin-PE40, титр составил 1:900 000. Спустя 40 дней после начала второго курса инъекций (день 80) минимальным титром антител обладала группа животных, получавших 4x10 мкг DARPin-LoPE (1:10 000), немного выше были значения у группы, получавшей 4x20 мкг DARPin-LoPE (1:30 000), максимальный титр антител наблюдался у мышей из группы, получавшей 4x10 мкг DARPin-PE40 (1:300 000).

Таким образом, DARPin-PE40 показал более высокую иммуногенность по сравнению с DARPin-LoPE, поскольку инъекции DARPin-PE40 приводят к образованию более высокого титра антител. Кроме того, иммунный ответ на DARPin-PE40 обладает более долгосрочным эффектом в сравнении с низкоиммуногенным вариантом белка. В группе мышей, получавших 4x20 мкг DARPin-LoPE за курс, иммунный ответ угасает медленнее, чем у мышей, получавших 4x10 мкг DARPin-LoPE.



**Рисунок 34. Изменение титра антител, специфичных к исследуемым белкам. С – титр антител до начала введения белков. PBS – мыши, получавшие инъекции фосфатно-солевого буфера, контрольная группа; DARPin-LoPE 4×10 µg – мыши, получавшие инъекции по 10 мкг DARPin-LoPE (40 мкг на курс, 80 мкг суммарно); DARPin-LoPE 4×20 µg – мыши, получавшие**



инъекции по 20 мкг DARPin-LoPE (80 мкг на курс, 160 мкг суммарно); DARPin-PE40 4×10 ug – мыши, получавшие инъекции по 10 мкг DARPin-PE40 (40 мкг на курс, 80 мкг суммарно), DARPin – мыши, получавшие инъекции по 10 мкг DARPin 9-29 (40 мкг на курс, 80 мкг суммарно). «\*» - , достоверно отличающиеся от значений контрольной группы  $p < 0.05$ ; “#” – значения, достоверно отличающиеся от остальных экспериментальных («DARPin-LoPE 4×10 ug» и «DARPin-LoPE 4×20 ug»)  $p < 0.05$  (Критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони).

Нами было показано, что DARPin-LoPE в использованных дозах обладает меньшей неспецифической токсичностью и приводит к менее выраженным побочным эффектам, таким как повышенная проницаемость сосудов и деградация тканей печени, что является известной проблемой, ограничивающей использование таргетных токсинов на основе ETA в клинической практике [Minckwitz и др., 2005; Pai-Scherf и др., 1999]. DARPin-LoPE приводил к образованию меньшего титра антител после первого курса инъекций, и концентрация антител к нему падала быстрее, что говорит о менее эффективном образовании клеток памяти. Данное исследование проводилось на мышах, однако, как было показано, эпитопы В-лимфоцитов мыши и человека в домене III PE частично совпадают [Liu и др., 2012], что дает основание прогнозировать и иммуногенность для человека. Таким образом, DARPin-LoPE представляется более перспективным агентом, по сравнению с DARPin-PE40, с точки зрения неспецифической токсичности и возможности применения повторными курсами.

## Заключение

В результате выполненной работы были получены полностью генетически кодируемые агенты для визуализации либо подавления роста ERBB2-положительных раковых клеток на основе адресного модуля DARPin 9-29. DARPin 9-29 легко включается в белки слияния, которые успешно нарабатываются в бактериальной системе экспрессии. Разработанные таким образом молекулы DARPin-mCherry, DARPin-miniSOG, DARPin-PE40 и DARPin-LoPE сохранили функциональные свойства составляющих их модулей, и полученные белки могут использоваться как в качестве самостоятельных препаратов для визуализации или удаления перерожденных клеток, так и в составе более сложных многофункциональных агентов [Guryev и др., 2018; Mironova и др., 2017].

Фотосенсибилизатор DARPin-miniSOG вызывает некроз раковых клеток за счет генерации активных форм кислорода под действием синего света. Значение  $IC_{50}$  для белка DARPin-miniSOG по отношению к ERBB2-положительным клеткам SK-BR-3 составляет 0,8 мкМ, что на порядок меньше, чем у рутинно используемого в терапии антитела трастузумаб [Fujita и др., 2006]. Однако использование DARPin-miniSOG в качестве основы для фотодинамической терапии *in vivo* осложняется сильным поглощением синего света тканями и тем фактом, что DARPin-miniSOG способен к быстрой интернализации в составе комплекса с ERBB2, после чего рекомбинантный белок обнаруживается в лизосомах, где, скорее всего, деградирует, а рецептор частично возвращается на мембрану клетки в результате медленной рециклизации. Возможным путем развития этой модели является использование DARPin-miniSOG в комбинации с другими препаратами. Так как DARPin-miniSOG, находясь на плазматической мембране клетки, увеличивает ее проницаемость, этот эффект можно использовать для улучшения проникновения терапевтических препаратов в клетку.

Быстрая интернализация DARPin 9-29 может использоваться для внутриклеточной доставки токсинов, что было успешно реализовано при создании белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE. Оба этих агента высокотоксичны в отношении ERBB2-гиперэксперсирующих клеток и вызывают в них апоптоз,  $IC_{50}$  для белков по отношению к клеткам SK-BR-3 составляет 0,1 пМ в случае DARPin-PE40 и 16 пМ в случае DARPin-LoPE. DARPin-PE40 и DARPin-LoPE эффективно подавляют рост опухолевых клеток *in vivo* и являются перспективными агентами для терапии ERBB2-положительного рака. При этом использование фрагмента экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* со сниженной иммуногенностью позволяет уменьшить побочные эффекты терапии, такие как повышение проницаемости сосудов, повреждение почек и

образование нейтрализующих антител. Однако, несмотря на более высокую иммуногенность, токсин PE40 также имеет терапевтический потенциал, так как может доставляться к опухолевым клеткам в составе конъюгированных с дарпином липосом, экранирующих PE40 от нейтрализующих антител [Deуev и др., 2018b].

## Выводы:

1. Показано, что DARPin 9-29 в составе целого ряда рекомбинантных белков, включающих наряду с DARPin 9-29 другие функционально активные полипептиды (флуоресцентный белок mCherry, фототоксин miniSOG, производные белкового экзотоксина A), сохраняет способность специфично и селективно связываться с ERBB2 на поверхности опухолевых клеток.
2. Показано, что DARPin-miniSOG избирательно уничтожает ERBB2-гиперэкспрессирующие клетки под действием синего света, индуцируя в них некроз, IC<sub>50</sub> для клеток аденокарциномы молочной железы составила 0,8 мкМ.
3. Обнаружено, что взаимодействие DARPin-miniSOG с ERBB2 на поверхности опухолевых клеток приводит к рецептор-опосредованной интернализации комплекса адресного белка с рецептором, при этом скорость интернализации комплекса DARPin-miniSOG/ERBB2 выше, чем у 4D5scFv-miniSOG/ERBB2.
4. Показано, что адресные токсины DARPin-PE40 и DARPin-LoPE высокотоксичны в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих раковых клеток *in vitro* и вызывают в них апоптоз, IC<sub>50</sub> для клеток аденокарциномы молочной железы составили 0,1 пМ и 16 пМ соответственно.
5. Установлено, что адресные токсины DARPin-PE40 и DARPin-LoPE эффективно подавляют рост ERBB2-положительных опухолей в ксенографтных моделях *in vivo*.
6. Показано, что DARPin-LoPE проявляет меньшую общую токсичность и иммуногенность по сравнению с DARPin-PE40.

## Список сокращений

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста человека 1;

EpCAM – молекула клеточной адгезии эпителия;

DARPin – искусственный белок с анкириновыми повторами, дарпин (Designed Ankyrin Repeat Protein);

DMSO – диметилсульфоксид;

FDA – американское управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration);

FITC – флуоресцеинизотиоцианат;

FMN – флавинмононуклеотид;

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (ERBB2);

IgG – иммуноглобулин изотипа G;

IgE – иммуноглобулин изотипа E;

LoPE – укороченный вариант экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa* со сниженной иммуногенностью;

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид;

PBS – фосфатно-солевой буфер;

PBS-BSA – фосфатно-солевой буфер с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина;

PE40 – укороченный вариант экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa* с молекулярной массой 40 кДа;

scFv – одноцепочечный фрагмент вариабельной части антитела;

SDS – додецилсульфат натрия;

BSA – бычий сывороточный альбумин.

## Список литературы

1. Agostinis P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. // *CA Cancer J Clin.* 2012. Т. 61. № 4. С. 250–281.
2. Al-Dasooqi N. et al. Trastuzumab induces gastrointestinal side effects in HER2-overexpressing breast cancer patients // *Invest. New Drugs.* 2009. Т. 27. № 2. С. 173–178.
3. Arai S. et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial // *Cytotherapy.* 2008. Т. 10. № 6. С. 625–632.
4. Armstrong D.K. et al. Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer // *N. Engl. J. Med.* 2006. Т. 354. № 1. С. 34–43.
5. Arteaga C.L., Engelman J.A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics // *Cancer Cell.* 2014. Т. 25. № 3. С. 282–303.
6. Austin C.D. et al. Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. Т. 15. № 12. С. 5268–5282.
7. Azaro A. et al. First-in-class phase I study evaluating MP0250, a VEGF and HGF neutralizing DARPIN molecule, in patients with advanced solid tumors // *J. Clin. Oncol.* 2018. Т. 36. № 15. Supplement C. С. 2520–2520.
8. Baird R. et al. MP0274-CP101: A phase 1, first-in-human, single-arm, multi-center, open-label, dose escalation study to assess safety, tolerability, and pharmacokinetics of MP0274 in patients with advanced HER2-positive solid tumors // *Cancer Res.* 2018. Т. 78. № 4 Supplement. C. OT1- 03– 02.
9. Balduzzi S. et al. Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014. № 6. С. CD006242.
10. Baselga J. et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. // *J. Clin. Oncol.* 1996. Т. 14. № 3. С. 737–744.
11. Baselga J. Herceptin® alone or in combination with chemotherapy in the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trials // *Oncology.* 2001. Т. 61. № 2. С. 14–21.
12. Baselga J., Swain S.M. CLEOPATRA: A phase III evaluation of Pertuzumab and Trastuzumab for HER2-positive metastatic breast cancer // *Clin. Breast Cancer.* 2010. Т. 10. № 6. С. 489–491.
13. Benmebarek M.-R. et al. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Т. 20. № 6. С. 1283.

14. Benson R.C. et al. Cellular autofluorescence-is it due to flavins? // *J. Histochem. Cytochem.* 1979. T. 27. № 1. C. 44–48.
15. Bery N. et al. KRAS-specific inhibition using a DARPIn binding to a site in the allosteric lobe // *Nat. Commun.* 2019. T. 10. № 1. C. 2607.
16. Binz H.K. et al. Design and characterization of MP0250, a tri-specific anti-HGF/anti-VEGF DARPIn® drug candidate // *MAbs.* 2017. T. 9. № 8. C. 1262–1269.
17. Blackwell K.L. et al. Overall Survival Benefit With Lapatinib in Combination With Trastuzumab for Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Metastatic Breast Cancer: Final Results From the EGF104900 Study // *J. Clin. Oncol.* 2012. T. 30. № 21. C. 2585–2592.
18. Bookman M.A. et al. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, Trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: A phase II trial of the gynecologic oncology group // *J. Clin. Oncol.* 2003. T. 21. № 2. C. 283–290.
19. Borovjagin A. et al. Noninvasive monitoring of mRFP1- and mCherry-labeled oncolytic adenoviruses in an orthotopic breast cancer model by spectral imaging. // *Mol. Imaging.* 2010. T. 9. № 2. C. 59–75.
20. Bose R. et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer // *Cancer Discov.* 2013. T. 3. № 2. C. 224–237.
21. Brabec M. et al. Opening of size-selective pores in endosomes during human rhinovirus serotype 2 in vivo uncoating monitored by single-organelle flow analysis // *J. Virol.* 2005. T. 79. № 2. C. 1008–1016.
22. Bray F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA. Cancer J. Clin.* 2018. T. 68. № 6. C. 394–424.
23. Bulina M.E. et al. A genetically encoded photosensitizer // *Nat. Biotechnol.* 2006. T. 24. № 1. C. 95–99.
24. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 2007. T. 1776. № 1. C. 86–107.
25. Cao Y. et al. Design optimization and characterization of Her2/neu-targeted immunotoxins: comparative in vitro and in vivo efficacy studies // *Oncogene.* 2014. T. 33. № 4. C. 429–439.
26. Carter T., Mulholland P., Chester K. Antibody-targeted nanoparticles for cancer treatment // *Immunotherapy.* 2016. T. 8. № 8. C. 941–958.

27. Chauhan V.P. et al. Delivery of Molecular and Nanoscale Medicine to Tumors: Transport Barriers and Strategies // *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2011. T. 2. № 1. C. 281–298.
28. Chilakamarthi U., Giribabu L. Photodynamic therapy: past, present and future // *Chem. Rec.* 2017. T. 17. № 8. C. 775–802.
29. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. T. 48. № 6. C. 749–762.
30. Cobleigh M.A. et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease // *J. Clin. Oncol.* 1999. T. 17. № 9. C. 2639–2648.
31. Coussens L. et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene // *Science.* 1985. T. 230. № 4730. C. 1132–1139.
32. Deeks E.D. Neratinib: First Global Approval // *Drugs.* 2017. T. 77. № 15. C. 1695–1704.
33. Dey N. et al. A critical role for HER3 in HER2-amplified and non-amplified breast cancers: function of a kinase-dead RTK // *Am. J. Transl. Res.* 2015. T. 7. № 4. C. 733–750.
34. Deyev S. et al. Synthesis, characterization, and selective delivery of DARPIn–gold nanoparticle conjugates to cancer cells // *Bioconjug. Chem.* 2017. T. 28. № 10. C. 2569–2574.
35. Deyev S. et al. Selective staining and eradication of cancer cells by protein-carrying DARPIn-functionalized liposomes // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018a. T. 130. C. 296–305.
36. Deyev S. et al. Selective staining and eradication of cancer cells by protein-carrying DARPIn-functionalized liposomes // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018b. T. 130. C. 296–305.
37. Dreier B. et al. Development of a generic adenovirus delivery system based on structure-guided design of bispecific trimeric DARPIn adapters // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. T. 110. № 10. C. E869–E877.
38. Farag S.S., Caligiuri M.A. Human natural killer cell development and biology // *Blood Rev.* 2006. T. 20. № 3. C. 123–137.
39. Forrer P. et al. A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins // *FEBS Lett.* 2003. T. 539. № 1–3. C. 2–6.
40. Friedman L.M. et al. Synergistic down-regulation of receptor tyrosine kinases by combinations of mAbs: Implications for cancer immunotherapy // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. T. 102. № 6. C. 1915–



1920.

41. Friedrich K. et al. DARPin-targeting of measles virus: unique bispecificity, effective oncolysis, and enhanced safety // *Mol. Ther.* 2013. T. 21. № 4. C. 849.
42. Fujita T. et al. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer // *Br. J. Cancer.* 2006. T. 94. № 2. C. 247–52.
43. Galluzzi L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death Differ.* 2018. T. 25. № 3. C. 486–541.
44. Garrett T.P.J. et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors // *Mol. Cell.* 2003. T. 11. № 2. C. 495–505.
45. Geisow M.J., Evans W.H. pH in the endosome. Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis. // *Exp. Cell Res.* 1984. T. 150. № 1. C. 36–46.
46. Geran R. et al. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems // *Cancer Chemother. Reports.* 1972. T. 3. C. 1–104.
47. Geyer C.E. et al. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer // *N. Engl. J. Med.* 2006. T. 355. № 26. C. 2733–2743.
48. Girotti A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2001. T. 63. № 1–3. C. 103–113.
49. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting // *Methods in molecular biology.* 2010. T. 624. C. 25–37.
50. Grove T.Z., Cortajarena A.L., Regan L. Ligand binding by repeat proteins: natural and designed // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. T. 18. № 4. C. 507–515.
51. Guryev E.L. et al. Radioactive (<sup>90</sup>Y) upconversion nanoparticles conjugated with recombinant targeted toxin for synergistic nanotheranostics of cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018. T. 115. № 39. C. 9690–9695.
52. Guryev E.L. et al. Preclinical study of biofunctional polymer-coated upconversion nanoparticles // *Toxicol. Sci.* 2019. T. 170. № 1. C. 123–132.
53. Hagen S. et al. Modular adeno-associated virus (rAAV) vectors used for cellular virus-directed enzyme prodrug therapy // *Sci. Rep.* 2014. T. 4. C. 3759.
54. Hainsworth J.D. et al. Targeted Therapy for advanced solid tumors on the basis of molecular profiles: results from MyPathway, an open-label, phase IIa multiple basket study // *J. Clin. Oncol.*

2018. T. 36. № 6. C. 536–542.

55. Hammill J.A. et al. Designed ankyrin repeat proteins are effective targeting elements for chimeric antigen receptors // *J. Immunother. cancer*. 2015. T. 3. C. 55.

56. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // *Cell*. 2000. T. 100. № 1. C. 57–70.

57. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell*. 2011. T. 144. № 5. C. 646–674.

58. Hanauer J.R. et al. Enhanced lysis by bispecific oncolytic measles viruses simultaneously using HER2/neu or EpCAM as target receptors // *Mol. Ther. oncolytics*. 2016. T. 3. C. 16003.

59. Hansen S. et al. Design and applications of a clamp for Green Fluorescent Protein with picomolar affinity // *Sci. Rep.* 2017. T. 7. № 1. C. 16292.

60. Harari D., Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer // *Oncogene*. 2000. T. 19. № 53. C. 6102–6114.

61. Harbeck N. et al. HER2 dimerization inhibitor Pertuzumab - mode of action and clinical data in breast cancer // *Breast Care*. 2013. T. 8. № 1. C. 49–55.

62. Haslekås C. et al. The inhibitory effect of ErbB2 on epidermal growth factor-induced formation of clathrin-coated pits correlates with retention of epidermal growth factor receptor-ErbB2 oligomeric complexes at the plasma membrane // *Mol. Biol. Cell*. 2005. T. 16. № 12. C. 5832–5842.

63. Hassan R. et al. Phase 1 study of the antimesothelin immunotoxin SS1P in combination with pemetrexed and cisplatin for front-line therapy of pleural mesothelioma and correlation of tumor response with serum mesothelin, megakaryocyte potentiating factor, and cancer antigen // *Cancer*. 2014. T. 120. № 21. C. 3311–3319.

64. Hendriks B.S. et al. Coregulation of epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels and locations: quantitative analysis of HER2 overexpression effects // *Cancer Res*. 2003. T. 63. № 5. C. 1130–1137.

65. Hommelgaard A.M., Lerdrup M., Deurs B. van. association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor // *Mol. Biol. Cell*. 2004. T. 15. № 4. C. 1557–1567.

66. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. 1990. T. 96. № 1. C. 23–28.

67. Ivanova J.L. et al. Application of fusion protein 4D5 scFv-dibarnase:barstar-gold complex for studying P185HER2 receptor distribution in human cancer cells // *Biochimie*. 2012. T. 94. № 8. C.

1833–1836.

68. Jin T. et al. A quantum dot-based ratiometric pH sensor. // *Chem. Commun. (Camb)*. 2010. T. 46. № 14. C. 2408–2410.
69. Jost C. et al. Structural basis for eliciting a cytotoxic effect in HER2-overexpressing cancer cells via binding to the extracellular domain of HER2 // *Structure*. 2013. T. 21. № 11. C. 1979–1991.
70. Jost C., Plückthun A. Engineered proteins with desired specificity: DARPins, other alternative scaffolds and bispecific IgGs // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2014. T. 27. № 1. C. 102–112.
71. Junttila T.T. et al. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. T. 128. № 2. C. 347–356.
72. Karsch-Bluman A. et al. Tissue necrosis and its role in cancer progression // *Oncogene*. 2019. T. 38. № 11. C. 1920–1935.
73. Kiemle-Kallee J. et al. MP0250, a VEGF- and HGF-blocking multi-DARPin drug candidate, in combination with tyrosine-kinase-inhibitors targeting EGFR-mutated NSCLC: Preclinical rationale and phase Ib/II study outline // *Cancer Res.* 2018. T. 78. № 13 Supplement. C. CT149.
74. Klapper L.N. et al. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2 // *Cancer Res.* 2000. T. 60. № 13. C. 3384–3388.
75. Knop S. et al. MP0250 combined with Bortezomib and Dexamethazone in multiple myeloma in patients previously exposed to proteasome inhibitors and immunomodulatory drugs // *Blood*. 2018. C. 1980–1980.
76. Kobe B., Kajava A. V. When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures // *Trends Biochem. Sci.* 2000. T. 25. № 10. C. 509–515.
77. Kochenderfer J.N. et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor // *J. Clin. Oncol.* 2015. T. 33. № 6. C. 540–549.
78. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. 1975. T. 256. № 5517. C. 495–497.
79. Kramer L. et al. Non-invasive in vivo imaging of tumour-associated cathepsin B by a highly selective inhibitory DARPin // *Theranostics*. 2017. T. 7. № 11. C. 2806–2821.
80. Kreitman R.J. et al. Phase I Trial of Anti-CD22 recombinant immunotoxin Moxetumomab

- Pasudotox (CAT-8015 or HA22) in patients with hairy cell leukemia // *J. Clin. Oncol.* 2012. T. 30. № 15. C. 1822–1828.
81. Kroemer G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. // *Cell Death Differ.* 2005. T. 12 Suppl 2. C. 1463–1467.
82. Kroemer G. et al. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy // *Annu. Rev. Immunol.* 2013. T. 31. № 1. C. 51–72.
83. Kroemer G., Galluzzi L. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 // *Cell Death Differ.* 2008. T. 16. № 1. C. 3–11.
84. Krop I.E. et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and central nervous system metastases: a retrospective, exploratory analysis in EMILIA // *Ann. Oncol.* 2015. T. 26. № 1. C. 113–119.
85. Krop I.E. et al. 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 // *Lancet Oncol.* 2017. T. 18. № 6. C. 743–754.
86. Kummer L. et al. Structural and functional analysis of phosphorylation-specific binders of the kinase ERK from designed ankyrin repeat protein libraries // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. T. 109. № 34. C. E2248–E2257.
87. Kummer L. et al. Knowledge-based design of a biosensor to quantify localized ERK activation in living cells // *Chem. Biol.* 2013. T. 20. № 6. C. 847–856.
88. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature.* 1970. T. 15. № 227(5259). C. 680–685.
89. Lengyel E. Ovarian Cancer Development and Metastasis // *Am. J. Pathol.* 2010. T. 177. № 3. C. 1053–1064.
90. Li D.-L. et al. Multifunctional superparamagnetic nanoparticles conjugated with fluorescein-labeled designed ankyrin repeat protein as an efficient HER2-targeted probe in breast cancer // *Biomaterials.* 2017. T. 147. C. 86–98.
91. Li J., Zhang J. LHRH-PE40-induced vascular leak syndrome // *Toxicol. Mech. Methods.* 2006. T. 16. № 8. C. 473–476.
92. Lin J.Y. et al. Optogenetic inhibition of synaptic release with chromophore-assisted light inactivation (CALI) // *Neuron.* 2013. T. 79. № 2. C. 241–253.

93. Liu W. et al. Recombinant immunotoxin engineered for low immunogenicity and antigenicity by identifying and silencing human B-cell epitopes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. T. 109. № 29. C. 11782–11787.
94. Loibl S., Gianni L. HER2-positive breast cancer // *Lancet.* 2017. T. 389. № 10087. C. 2415–2429.
95. Longva K.E. et al. Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2 // *Int. J. Cancer.* 2005. T. 116. № 3. C. 359–367.
96. Ma C.X. et al. Neratinib efficacy and circulating tumor DNA detection of HER2 mutations in *HER2* nonamplified metastatic breast cancer // *Clin. Cancer Res.* 2017. T. 23. № 19. C. 5687–5695.
97. Makhijani K. et al. Precision optogenetic tool for selective single- and multiple-cell ablation in a live animal model system // *Cell Chem. Biol.* 2017. T. 24. № 1. C. 110–119.
98. Martin-Killias P. et al. A novel fusion toxin derived from an EpCAM-specific designed ankyrin repeat protein has potent antitumor activity // *Clin Cancer Res.* 2011. T. 17. № 1. C. 100–110.
99. Maude S.L. et al. Chimeric antigen receptor T Cells for sustained remissions in leukemia // *N. Engl. J. Med.* 2014. T. 371. № 16. C. 1507–1517.
100. Mazor R., King E.M., Pastan I. Strategies to reduce the immunogenicity of recombinant immunotoxins // *Am. J. Pathol.* 2018. T. 188. № 8. C. 1736–1743.
101. Ménard S. et al. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma // *J. Cell. Physiol.* 2000. T. 182. № 2. C. 150–162.
102. Meric-Bernstam F. et al. Single agent activity of ZW25, a HER2-targeted bispecific antibody, in heavily pretreated HER2-expressing cancers // *J. Clin. Oncol.* 2018. T. 36. № 15\_suppl. C. 2500–2500.
103. Meric-Bernstam F. et al. Advances in HER2-targeted therapy: Novel agents and opportunities beyond breast and gastric cancer // *Clin. Cancer Res.* 2019. T. 25. № 7. C. 2033–2041.
104. Mew D. et al. Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates. // *J. Immunol.* 1983. T. 130. № 3. C. 1473–1477.
105. Miller J.S. et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer // *Blood.* 2005. T. 105. № 8. C. 3051–3057.
106. Minckwitz G. von et al. Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas // *Breast Cancer Res.* 2005. T. 7. № 5. C. R617-626.

107. Mironova K.E. et al. Genetically encoded immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro // *Theranostics*. 2013. T. 3. № 11. C. 831–840.
108. Mironova K.E. et al. Ultraviolet phototoxicity of upconversion nanoparticles illuminated with near-infrared light // *Nanoscale*. 2017. T. 9. № 39. C. 14921–14928.
109. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods*. 1983. T. 65. № 1–2. C. 55–63.
110. Münch R.C. et al. Displaying high-affinity ligands on adeno-associated viral vectors enables tumor cell-specific and safe gene transfer // *Mol. Ther.* 2013. T. 21. № 1. C. 109–118.
111. Nahta R., Hung M., Esteva F.J. The HER-2-targeting antibodies Trastuzumab and Pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells // *Cancer Res.* 2004. T. 64. C. 2343–2346.
112. Nazareus M. et al. In vitro interaction of colloidal nanoparticles with mammalian cells: What have we learned thus far? // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2014. T. 5. C. 1477–1490.
113. Pai-Scherf L.H. et al. Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor // *Clin. Cancer Res.* 1999. T. 5. № 9. C. 2311–2315.
114. Perez E.A. et al. HER2 Testing by Local, Central, and Reference Laboratories in Specimens From the North Central Cancer Treatment Group N9831 Intergroup Adjuvant Trial // *J. Clin. Oncol.* 2006. T. 24. № 19. C. 3032–3038.
115. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin): binding proteins for research, diagnostics, and therapy // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. T. 55. № 1. C. 489–511.
116. Proshkina G. et al. DARPin<sub>9-29</sub>-targeted mini gold nanorods specifically eliminate HER2-overexpressing cancer cells // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. T. 11. № 38. C. 34645–34651.
117. Proshkina G.M. et al. A new anticancer toxin based on HER2/neu-specific DARPin and photoactive flavoprotein miniSOG // *Biochimie*. 2015. T. 118. C. 116–122.
118. Rezvani K. et al. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy // *Mol. Ther.* 2017. T. 25. № 8. C. 1769–1781.
119. Riccio G. et al. Trastuzumab and target-therapy side effects: Is still valid to differentiate anthracycline Type I from Type II cardiomyopathies? // *Hum. vaccines Immunother.* 2016. T. 12. № 5. C. 1124–1131.
120. Rubnitz J.E. et al. NKAML: A pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical

- natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia // *J. Clin. Oncol.* 2010. T. 28. № 6. C. 955–959.
121. Russell S.J., Peng K.-W., Bell J.C. Oncolytic virotherapy. // *Nat. Biotechnol.* 2012. T. 30. № 7. C. 658–670.
122. Ryumina A.P. et al. Flavoprotein miniSOG as a genetically encoded photosensitizer for cancer cells // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. T. 1830. № 11. C. 5059–5067.
123. Santin A.D. et al. Trastuzumab treatment in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma overexpressing HER2/neu // *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2008. T. 102. № 2. C. 128–131.
124. Sarkisyan K.S. et al. KillerOrange, a genetically encoded photosensitizer activated by blue and green light // *PLoS One.* 2015. T. 10. № 12. C. e0145287.
125. Sarup J.C. et al. Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth // *Growth Regul.* 1991. T. 1. № 2. C. 72–82.
126. Satyanarayanajois S., Hill R. Medicinal chemistry for 2020 // *Future Med. Chem.* 2011. T. 3. № 14. C. 1765–1786.
127. Scaltriti M. et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer // *J. Natl. Cancer Inst.* 2007. T. 99. № 8. C. 628–38.
128. Schechter A.L. et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen // *Nature.* 1984. T. 312. № 5994. C. 513–516.
129. Scheuer W. et al. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models // *Cancer Res.* 2009. T. 69. № 24. C. 9330–9336.
130. Schilling J., Schöppe J., Plückthun A. From DARPins to LoopDARPins: Novel LoopDARPin design allows the selection of low picomolar binders in a single round of ribosome display // *J. Mol. Biol.* 2014. T. 426. № 3. C. 691–721.
131. Schmidt M.M., Wittrup K.D. A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting // *Mol. Cancer Ther.* 2009. T. 8. № 10. C. 2861–2871.
132. Semba K. et al. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985. T. 82. № 19. C. 6497–6501.
133. Serna N. et al. Protein-based therapeutic killing for cancer therapies // *Trends Biotechnol.* 2018.

T. 36. № 3. C. 318–335.

134. Shah D.K., Betts A.M. Antibody biodistribution coefficients // *MAbs*. 2013. T. 5. № 2. C. 297–305.

135. Shapira A., Benhar I. Toxin-based therapeutic approaches // *Toxins*. 2010. T. 2. № 11. C. 2519–2583.

136. Shcherbo D. et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging // *Nat. Methods*. 2007. T. 4. № 9. C. 741–746.

137. Shih C. et al. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts // *Nature*. 1981. T. 290. № 5803. C. 261–264.

138. Shilova O.N. et al. Disassembling a cancer puzzle: Cell junctions and plasma membrane as targets for anticancer therapy // *J. Control. Release*. 2018. T. 286. C. 125–136.

139. Shilova O.N., Shilov E.S., Deyev S.M. The effect of trypan blue treatment on autofluorescence of fixed cells // *Cytom. Part A*. 2017. T. 91. № 9. C. 917–925.

140. Shipunova V.O. et al. Versatile platform for nanoparticle surface bioengineering based on SiO<sub>2</sub>-binding peptide and proteinaceous Barnase\*Barstar interface // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. T. 10. № 20. C. 17437–17447.

141. Shipunova V.O. et al. Self-assembling nanoparticles biofunctionalized with magnetite-binding protein for the targeted delivery to HER2/neu overexpressing cancer cells // *J. Magn. Magn. Mater.* 2019. T. 469. C. 450–455.

142. Shu X. et al. A Genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms // *PLoS Biol*. 2011. T. 9. № 4. C. e1001041.

143. Siegler E. et al. Designed ankyrin repeat proteins as Her2 targeting domains in chimeric antigen receptor-engineered T cells // *Hum. Gene Ther*. 2017. T. 28. № 9. C. 726–736.

144. Simeon R., Chen Z. In vitro-engineered non-antibody protein therapeutics // *Protein Cell*. 2018. T. 9. № 1. C. 3–14.

145. Singh R. et al. Synergistic antitumor activity of anti-CD25 recombinant immunotoxin LMB-2 with chemotherapy // *Clin. Cancer Res*. 2012. T. 18. № 1. C. 152–160.

146. Slamon D. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // *Science*. 1987. T. 235. № 4785. C. 177–182.

147. Smithwick E., Stewart M.W. Designed ankyrin repeat proteins: A look at their evolving use in



- medicine with a focus on the treatment of chorioretinal vascular disorders // *Antiinflamm. Antiallergy. Agents Med. Chem.* 2017. T. 16. № 999. C. 33–45.
148. Sokolova E. et al. Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPIn possesses a strong selective cytotoxic effect in vitro and a potent antitumor activity in vivo // *J. Control. Release.* 2016. T. 233. C. 48–56.
149. Sokolova E.A. et al. Recombinant immunotoxin 4D5scFv-PE40 for targeted therapy of HER2-positive tumors // *Acta Naturae.* 2015. T. 7. № 4. C. 93–96.
150. Sokolova E.A. et al. HER2-specific targeted toxin DARPIn-LoPE: immunogenicity and antitumor effect on intraperitoneal ovarian cancer xenograft model // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. T. 20. № 10. C. 2399.
151. Sorkin A., Goh L.K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs // *Exp. Cell Res.* 2009. T. 315. № 4. C. 683–696.
152. Sorkin A., Waters C.M. Endocytosis of growth factor receptors // *BioEssays.* 1993. T. 15. № 6. C. 375–382.
153. Souslova E.A., Mironova K.E., Deyev S.M. Applications of genetically encoded photosensitizer miniSOG: from correlative light electron microscopy to immunophotosensitizing // *J. Biophotonics.* 2017. T. 10. № 3. C. 338–352.
154. Staneloudi C. et al. Development and characterization of novel photosensitizer : scFv conjugates for use in photodynamic therapy of cancer // *Immunology.* 2007. T. 120. № 4. C. 512–517.
155. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display // *J. Mol. Biol.* 2008. T. 382. № 5. C. 1211–1227.
156. Stoka V., Turk V., Turk B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration // *Ageing Res. Rev.* 2016. T. 32. C. 22–37.
157. Stumpp M.T., Amstutz P. DARPins: a true alternative to antibodies // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2007. T. 10. № 2. C. 153–159.
158. Stumpp M.T., Binz H.K., Amstutz P. DARPins: a new generation of protein therapeutics // *Drug Discov. Today.* 2008. T. 13. № 15–16. C. 695–701.
159. Swain S.M. et al. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer // *N. Engl. J. Med.* 2015. T. 372. № 8. C. 724–734.
160. Tal M. et al. Sporadic amplification of the HER2 / neu protooncogene in adenocarcinomas of various tissues // *Cancer Res.* 1988. T. 48. № 6. C. 1517–1520.

161. Thomas M.P. et al. Leukocyte protease binding to nucleic acids promotes nuclear localization and cleavage of nucleic acid binding proteins // *J. Immunol.* 2014. T. 192. № 11. C. 5390–5397.
162. Tonn T. et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92 // *Cytotherapy.* 2013. T. 15. № 12. C. 1563–1570.
163. Valencia A., Morán J. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. T. 36. № 9. C. 1112–1125.
164. Verma S. et al. Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer // *N. Engl. J. Med.* 2012. T. 367. № 19. C. 1783–1791.
165. Vogel C.L. et al. First-line Herceptin ® monotherapy in metastatic breast cancer // *Oncology.* 2001. T. 61. № 2. C. 37–42.
166. Vorobyeva A. et al. Comparative evaluation of radioiodine and technetium-labeled DARPIn 9\_29 for radionuclide molecular imaging of HER2 expression in malignant tumors // *Contrast Media Mol. Imaging.* 2018. T. 2018. C. 6930425.
167. Vorobyeva A. et al. Indirect radioiodination of DARPIn G3 using N-succinimidyl-para-iodobenzoate improves the contrast of HER2 molecular imaging // *Int. J. Mol. Sci.* 2019a. T. 20. № 12. C. 3047.
168. Vorobyeva A. et al. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-labeled DARPIn G3 // *Sci. Rep.* 2019b. T. 9. № 1. C. 9405.
169. Vu T., Claret F.X. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer // *Front. Oncol.* 2012. T. 2. C. 62.
170. Waibel R. et al. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex // *Nat. Biotechnol.* 1999. T. 17. № 9. C. 897–901.
171. Wang Z. et al. Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation // *Mol. Biol. Cell.* 1999. T. 10. № 5. C. 1621–1636.
172. Weldon J.E., Pastan I. A guide to taming a toxin - recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer // *FEBS J.* 2011. T. 278. № 23. C. 4683–4700.
173. Wilkins O., Keeler A.M., Flotte T.R. CAR T-cell therapy: Progress and prospects // *Hum. Gene Ther. Methods.* 2017. T. 28. № 2. C. 61–66.
174. Winkler J. et al. EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins // *Mol. Cancer Ther.* 2009. T. 8. № 9. C. 2674–2683.

175. Wolff A.C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer // Arch. Pathol. Lab. Med. 2007. T. 131. № 1. C. 18–43.
176. Wu Y. et al. Rigidly connected multispecific artificial binders with adjustable geometries // Sci. Rep. 2017. T. 7. № 1. C. 11217.
177. Wu Y. et al. Structural basis for the selective inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1 determined by rigid DARPin–DARPin fusions // J. Mol. Biol. 2018. T. 430. № 14. C. 2128–2138.
178. Wuerstlein R., Harbeck N. Neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer // Rev. Recent Clin. Trials. 2017. T. 12. № 2. C. 81–92.
179. Yarden Y., Sliwkowski M.X. Untangling the ErbB signalling network // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2001. T. 2. № 2. C. 127–137.
180. Yoo J.-O., Ha K.-S. New Insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death // International review of cell and molecular biology. 2012. C. 139–174.
181. Yoon S.R. et al. Generation of donor natural killer cells from CD34+ progenitor cells and subsequent infusion after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation: a feasibility study // Bone Marrow Transplant. 2010. T. 45. № 6. C. 1038–1046.
182. You H. et al. Pheophorbide-a conjugates with cancer-targeting moieties for targeted photodynamic cancer therapy // Bioorg. Med. Chem. 2015. T. 23. № 7. C. 1453–1462.
183. Yu D. et al. Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A // Cancer Res. 1993. T. 53. № 4. C. 891–898.
184. Zahnd C. et al. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: Effects of affinity and molecular size // Cancer Res. 2010. T. 70. № 4. C. 1595–1605.
185. Zdobnova T. et al. A novel far-red fluorescent xenograft model of ovarian carcinoma for preclinical evaluation of HER2-targeted immunotoxins // Oncotarget. 2015. T. 6. № 31. C. 30919–30928.
186. Zellweger F. et al. A novel bispecific DARPin targeting FcγRIIB and FcεRI-bound IgE inhibits allergic responses // Allergy. 2017. T. 72. № 8. C. 1174–1183.
187. Zhang S. et al. Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers // Clin. Cancer Res. 1998. T. 4. № 2. C. 295–302.
188. Zhu C. et al. Safety and efficacy evaluation of pertuzumab in patients with solid tumors // Med.

2017. Т. 96. № 20. С. e6870.

189. Кузичкина Е.О., Шилова О.Н., Деев С.М. Механизм тушения флуоресценции белковых фотосенсибилизаторов на основе miniSOG в процессе интернализации рецептора HER2 // *Acta Naturae*. 2018. Т. 4. № 39. С. 87–94.

190. Миронова К.Е. и др. Гибридный белок Darpin-mCherry для флуоресцентной визуализации клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер Her2 / neu // *Биохимия*. 2014. Т. 79. № 12. С. 1700–1706.

191. Поляновский О.Л., Лебедеенко Е.Н., Деев С.М. ErbB-онкогены – мишени моноклональных антител // *Биохимия*. 2012. Т. 77. № 3. С. 289–311.

192. Прошкина Г.М. и др. Бифункциональный токсин DARP-LoPE на основе HER2-специфичного модуля неиммуноглобулиновой природы как перспективный агент для тераностики // *Молекулярная биология*. 2017. Т. 51. № 6. С. 997–1007.

193. Шилова О.Н. и др. Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксичного белка DARPin-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека // *Acta Naturae*. 2015. Т. 3. № 26. С. 141–148.

194. Шилова О.Н. и др. Цитотоксичность адресных HER2-специфичных фототоксинов на основе флавопротеида miniSOG определяется скоростью их интернализации. // *Доклады академии наук*. 2017. Т. 475. № 1. С. 106–109.

## Благодарности

Мне хотелось бы выразить благодарность своему руководителю Сергею Михайловичу Дееву за организацию научной работы и идейную поддержку, Галине Михайловне Прошкиной за непосредственное участие в планировании и постановке экспериментов и Екатерине Николаевне Лебедежке за прочтение и редактирование рукописи. Отдельно хочу поблагодарить сотрудников лаборатории медицинской биофотоники Нижегородского государственного университета имени Лобачевского, и особенно Евгению Александровну Соколову за плодотворное сотрудничество в исследовании свойств токсинов *in vivo*. Также хочется сказать большое спасибо всем коллективу лаборатории молекулярной иммунологии за участие в этом проекте, помощь словом и делом, а также возможность в любое время обсудить детали эксперимента.

И в заключение я хочу поблагодарить своего мужа за плодотворные обсуждения сути и текста диссертационной работы, свою дочь за возможность написать эту работу и родителей за живой интерес к моему исследованию и моральную поддержку.