

---

На правах рукописи

Шилова Ольга Николаевна

**СОЗДАНИЕ АДРЕСНЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ АГЕНТОВ НА  
ОСНОВЕ ERBB2-СПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА DARP<sub>in</sub> 9-29**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

**Научный руководитель:**

Деев Сергей Михайлович, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ИБХ РАН

**Официальные оппоненты:**

**Прасолов Владимир Сергеевич**, д.б.н., заведующий лабораторией клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

**Маргулис Борис Александрович**, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории защитных механизмов клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН).

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН).

Защита состоится «25» марта 2020 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук  
В.А. Олейников

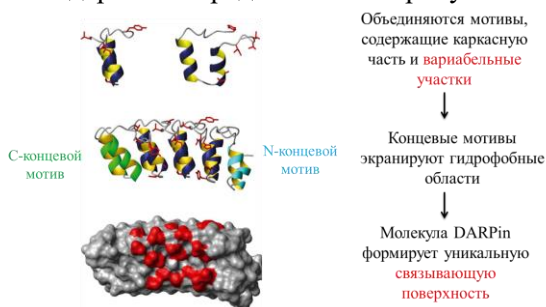


# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность исследования

Изменение демографических характеристик популяции в последние десятилетия приводит к неуклонному росту числа онкологических заболеваний, что заставляет разрабатывать новые эффективные методы их лечения, в том числе адресные препараты, селективно воздействующие на опухоли и позволяющие уменьшать нагрузку на здоровые ткани. Таргетная терапия также позволяет подавлять рост диссеминированных опухолей и метастазов, недоступных для хирургического удаления. Для адресной терапии рака в настоящее время используют в основном моноклональные антитела, специфические к опухолевым маркерам, однако эти молекулы как в качестве монопрепаратов, так и в качестве направляющих модулей имеют целый ряд недостатков. В качестве альтернативы антителам можно использовать другие белковые адресные модули и противораковые соединения на их основе, характеризующиеся относительной простотой наработки и минимальным побочным действием. Одними из таких перспективных адресных модулей являются дарпины, искусственные белки, полученные на основе анкириновых повторов.

Дарпины создают из нескольких полипептидных мотивов, содержащих каркасную «константную» часть и варибельные участки. Эти белки получают путем случайного объединения мотивов, формирующих связывающую поверхность, и отбирают по способности связываться с мишенью при помощи фагового или рибосомного дисплея. Схема получения дарпинов представлена на рисунке 1.



**Рисунок 1.** Схема создания белков DARPin.

Одной из первых терапевтических мишеней, использованных для отбора дарпинов, стал белок ERBB2 (HER2), известный своей ролью в канцерогенезе. За счет амплификации гена и/или изменения регуляции его экспрессии количество этого рецептора на поверхности клеток резко

увеличивается, что способствует постоянному проведению сигнала к выживанию и пролиферации. Гиперэкспрессия ERBB2 встречается в клетках рака молочной железы, яичника, желудка, поджелудочной железы, и глиобластомы. В клинической практике успешно применяются два ERBB2-специфичных моноклональных антитела: трастузумаб (и его конъюгат с химиотерапевтическим препаратом трастузумаб-эмтазин) и пертузумаб, а также низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназной активности ERBB2 лапатиниб и нератиниб. Тем не менее, токсичность и недостаточная эффективность существующего лечения стимулируют разработку новых адресных агентов с более высокой противоопухолевой активностью.

Применение дарпинов в качестве адресных модулей позволяет создавать гибридные таргетные агенты меньшего размера, лучше проникающие в опухоль, а также соединять адресный модуль с визуализирующими или токсичными модулями белковой природы генно-инженерным путем, обеспечивающим постоянство состава адресного агента. Использование дарпинов, специфичных к эпитопам ERBB2, отличающимся от эпитопов, которые узнают трастузумаб и пертузумаб, позволит расширить репертуар инструментов для персонализированной медицины ERBB2-положительных опухолей. В данной работе были исследованы возможности создания противоопухолевых агентов с различными механизмами действия на основе белка DARPIn 9-29, связывающегося с IV доменом внеклеточной части рецептора ERBB2.

**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 и практическая значимость работы**

В настоящей работе проведено комплексное исследование свойств целого ряда новых рекомбинантных белков различного состава и механизма действия, предназначенных для диагностики и терапии рака, созданных с использованием ERBB2-специфичного белка неиммуноглобулиновой природы DARPIn 9-29. Разработка ERBB2-специфичных препаратов имеет большую практическую значимость, так как мишень этих препаратов, поверхностный рецептор ERBB2, избыточно экспрессируется во многих типах опухолей и опосредует их агрессивные свойства. В первую очередь это относится к раку молочной железы, который является самым часто диагностируемым типом рака у женщин во всем мире, при этом на его долю приходится максимальная смертность от онкологических заболеваний среди женщин.

В данной работе белок DARPIn 9-29 впервые использован для доставки к раковым клеткам белкового фототоксина miniSOG и фрагментов бактериального экзотоксина А PE40 и LoPE. Впервые показано, что скорость рецептор-опосредованной интернализации DARPIn 9-29 и 4D5scFv, соединенных с фототоксином miniSOG, в комплексе с ERBB2 различна и коррелирует с уровнем специфической цитотоксичности этих белков. Впервые установлены механизмы действия созданных адресных белков DARPIn-miniSOG, DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE на опухолевые клетки-мишени, а именно, некроз в случае фототоксина и апоптоз в случае псевдомонадного экзотоксина.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 109 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования,

результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 194 ссылки. Диссертация содержит 34 рисунка и 1 таблицу.

### **Апробация работы**

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: «II Объединенный научный форум IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2019, Сочи, Россия); 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, XXIX 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).

По материалам работы опубликовано 11 статей в рецензируемых журналах.

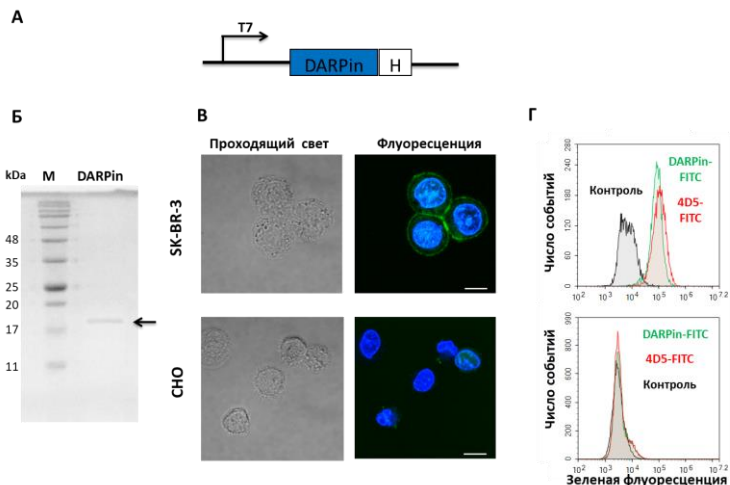
## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Сохранение функциональных свойств DARPin 9-29 в составе рекомбинантного белка**

#### **1.1. Выделение и характеристика адресного полипептида DARPin 9-29**

Для получения DARPin 9-29 была использована генетическая конструкция на базе плазмиды pET22b (Рис.2А). DARPin 9-29 был наработан в цитоплазме *Escherichia coli* штамма BL21(DE3) и выделен из растворимой фракции с помощью никель-аффинной хроматографии (Рис. 2Б). Выход чистого белка составил 60 мг с 1 л жидкой культуры. Для проверки функциональных свойств DARPin 9-29 был конъюгирован с флуоресцеинизотиоцианатом (DARPin-FITC). Методом флуоресцентной микроскопии показано, что DARPin-FITC специфично связывается с клетками аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующими ERBB2, и не связывается с клетками яичника китайского хомячка CHO, не имеющими данного рецептора (Рис. 2В) что

подтверждено данными проточной цитометрии клеток SK-BR-3 и CHO, окрашенных белком DARPin-FITC (Рис. 2Г).



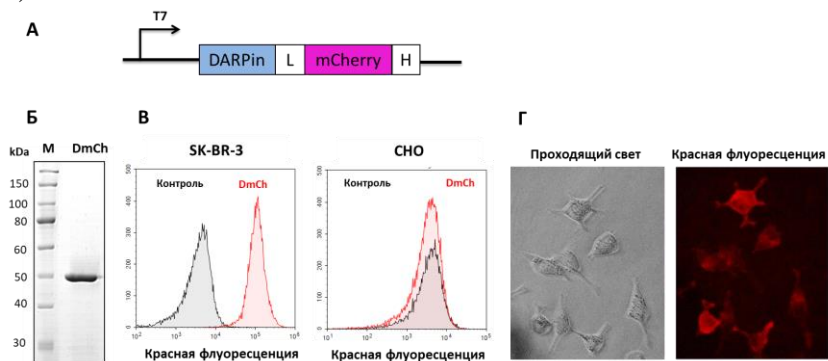
**Рисунок 2.** Выделение и свойства белка DARPin 9-29. **А.** Схема генетической конструкции: показаны промотор РНК-полимеразы фага Т7 (Т7), последовательность, кодирующая DARPin 9-29 (DARPin) и гексагистидиновая последовательность для очистки белка (Н). **Б.** Гель-электрофорез белка DARPin 9-29 в 12% денатурирующем ПААГ: М – стандарты молекулярных масс белков, DARPin – очищенный белок DARPin 9-29, молекулярная масса 18 кДа **В.** Флуоресцентная микроскопия клеток SK-BR-3 и CHO, окрашенных DARPin, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (DARPin-FITC). **Г.** Проточная цитофлуориметрия клеток SK-BR-3, окрашенных белком DARPin-FITC.

Таким образом, DARPin 9-29 был успешно наработан в бактериальной системе экспрессии, и специфичность его связывания с ERBB2-положительными опухолевыми клетками была подтверждена *in vitro*. Следующим шагом была проверка функциональных свойств DARPin 9-29 в составе рекомбинантных белков.

## 2. Выделение и характеристика флуоресцентного белка DARPin-mCherry

По сравнению с полноразмерными антителами, дарпины обладают рядом преимуществ, одним из которых является возможность не только конъюгации с низкомолекулярными флуорофорами, но и соединения с флуоресцентными или биолюминесцентными белками на уровне генетических конструкций. ERBB2-специфичный белок DARPin 9-29 был таким образом соединен с

дальнекрасным флуоресцентным белком mCherry, который благодаря своим спектральным свойствам может использоваться для визуализации клеток-мишеней как *in vitro*, так и *in vivo*. В работе использована генетическая конструкция на базе плазмиды pET22b, кодирующая белок DARPIn-mCherry, функциональные модули которого соединены гибким линкером на основе шарнирного региона тяжелой цепи иммуноглобулина IgG3 мыши, а на С-конец введена гексагистидиновая последовательность (Рис. 3А). Белок DARPIn-mCherry был наработан и очищен таким же образом, как и ранее DARPIn 9-29. 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 (Рис. 3Б). DARPIn-mCherry был протестирован *in vitro* на клетках, гиперэкспрессирующих ERBB2, при помощи проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Показано, что, как и свободный DARPIn 9-29, DARPIn-mCherry с высокой специфичностью окрашивает ERBB2-гиперэкспрессирующие клетки линии SK-BR-3 и не окрашивает клетки линии CHO, не имеющие данного рецептора (Рис. 3В, Г).



**Рисунок 3.** Выделение и свойства белка DARPIn-mCherry. **А.** Схема генетической конструкции: показаны промотор РНК-полимеразы фага Т7 (Т7), последовательности, кодирующие DARPIn 9-29 (DARPIn), гибкий линкер EFPKPSTPPGSSGGAP из шарнирного региона тяжелой цепи иммуноглобулина IgG3 мыши (L), флуоресцентный белок mCherry (mCherry) и гексагистидиновая последовательность (H). **Б.** Гель-электрофорез очищенного белка DARPIn-mCherry в 12% денатурирующем ПААГ: М – стандарты молекулярных масс белков, DmCh – очищенный белок DARPIn-mCherry, молекулярная масса 46 кДа. **В.** Результаты проточной цитофлуориметрии клеток SK-BR-3 и CHO, окрашенных белком DARPIn-mCherry. **Г.** Флуоресцентная микроскопия клеток SK-BR-3, окрашенных DARPIn-mCherry.



Аффинность белка DARPIn-mCherry к ERBB2 измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе BIAcore, в качестве мишени использовали иммобилизованный рекомбинантный внеклеточный домен ERBB2: p185HER2-ECD.  $K_D$  составила 4,5 нМ, что незначительно отличается от  $K_D$  DARPIn 9-29 (3,8 нМ).

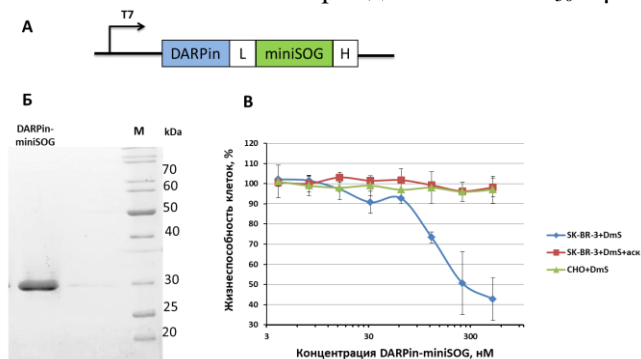
Таким образом, на примере флуоресцентного адресного белка DARPIn-mCherry показано, что DARPIn 9-29 сохраняет в составе белка слияния свою способность аффинно связываться с рецептором ERBB2 и избирательно окрашивать ERBB2-гиперэкспрессирующие клетки. Полученные данные позволили перейти к исследованиям DARPIn 9-29 в качестве направляющего агента для доставки к опухолевым клеткам белковых токсинов с различным механизмом действия.

### **3. Взаимодействие белка DARPIn-miniSOG с ERBB2-положительными опухолевыми клетками**

Для исследования свойств DARPIn 9-29 в качестве адресного компонента противоракового токсина использовали полностью генетически кодируемый фотосенсибилизатор DARPIn-miniSOG (Рис. 4А). Фототоксичный белок miniSOG получен на основе 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 был сконструирован другой ERBB2-специфичный белок 4D5scFv-miniSOG, адресным модулем для которого послужил одноцепочечный вариант антитела 4D5. Была показана специфическая фотоиндуцированная токсичность 4D5scFv-miniSOG в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих раковых клеток,  $IC_{50}$  составила 160 нМ. Недостатком 4D5scFv-miniSOG является склонность к агрегации, усложняющая его наработку в бактериальной системе: большая часть белка продуцируется в виде телец включения, а очистка, включающая денатурацию и рефолдинг, затрудняется диссоциацией нековалентно связанного кофактора, флавиномононуклеотида. Возможным решением этих проблем является использование в качестве адресного модуля DARPIn 9-29, который, как было показано, может быть эффективно наработан в бактериальной системе экспрессии и выделен из растворимой фракции с высоким выходом.

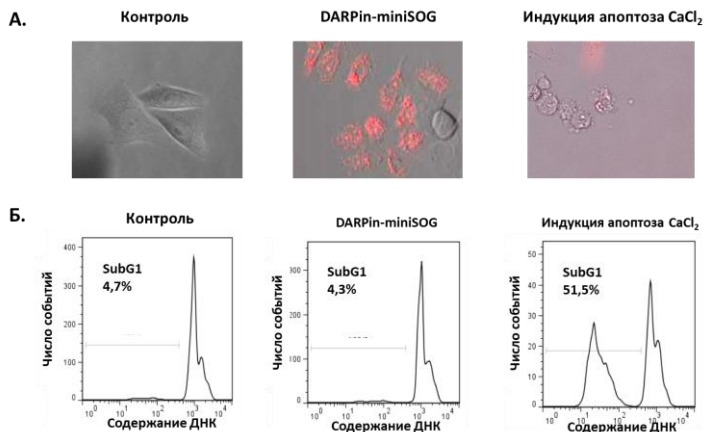
### 3.1. Фототоксичность белка DARPIn-miniSOG по отношению к ERBB2-положительным опухолевым клеткам

Фототоксин DARPIn-miniSOG (Рис. 4А), был наработан в цитоплазме *E. coli* и очищен никель-аффинной хроматографией, выход составил 15 мг чистого белка с 1 л жидкой культуры (Рис. 4Б). Токсичность DARPIn-miniSOG в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих клеток была показана *in vitro* при помощи МТТ-теста. Для этого клетки SK-BR-3 аденокарциномы молочной железы освещали синим светом мощностью 55 мВт/с<sup>2</sup> в присутствии DARPIn-miniSOG. Токсичность рассчитывали как значение IC<sub>50</sub>, равное концентрации исследуемого белка, при которой жизнеспособность клеток составила 50% от жизнеспособности клеток, облученных без добавления DARPIn-miniSOG. В качестве контроля использовали клетки яичника китайского хомячка CHO, не имеющие рецептора ERBB2. IC<sub>50</sub> для клеток SK-BR-3 составила 0,8 мМ. Для подтверждения прооксидантного механизма токсичности DARPIn-miniSOG клетки SK-BR-3 облучали в присутствии антиоксиданта – аскорбиновой кислоты. В присутствии аскорбиновой кислоты токсичность DARPIn-miniSOG снижается почти в 10 раз до значения IC<sub>50</sub> 7 мМ (Рис. 4В).



**Рисунок 4.** Получение и специфическая цитотоксичность белка DARPIn-miniSOG. **А.** Схема генетической конструкции DARPIn-miniSOG: промотор РНК-полимеразы фага Т7 (Т7), последовательности, кодирующие DARPIn 9-29 (DARPIn), гибкий линкер EFPKPSTPPGSSGGAP из шарнирного региона Н-цепи IgG3 мыши (L), фототоксичный белок miniSOG (miniSOG) и His<sub>6</sub>-последовательность (H). **Б.** Гель-электрофорез белка DARPIn-miniSOG в 12% денатурирующем ПААГ; М – стандарты молекулярных масс белков. **В.** Результаты МТТ-теста по цитотоксичности белка DARPIn-miniSOG (DmS) в отсутствие (кривые SK-BR-3+DmS и CHO+DmS) и в присутствии 60 нМ аскорбиновой кислоты (SK-BR-3+DmS+аск); SK-BR-3 – ERBB2-положительные клетки аденокарциномы молочной железы, CHO – клетки яичника китайского хомячка (отрицательный контроль).

Было установлено, что преимущественным механизмом гибели клеток, облученных в присутствии DARPIn-miniSOG, является некроз, что, вероятно, связано со свободнорадикальным повреждением плазматической мембраны. На некроз указывают как морфология клеток, так и раннее нарушение целостности мембраны, которое детектируется по окраске клеток иодистым пропидием (Рис. 5А). В клетках SK-BR-3, облученных синим светом в присутствии DARPIn-miniSOG, также не наблюдалось фрагментации ДНК, характерной для клеток, гибнущих в результате апоптоза (Рис. 5Б).

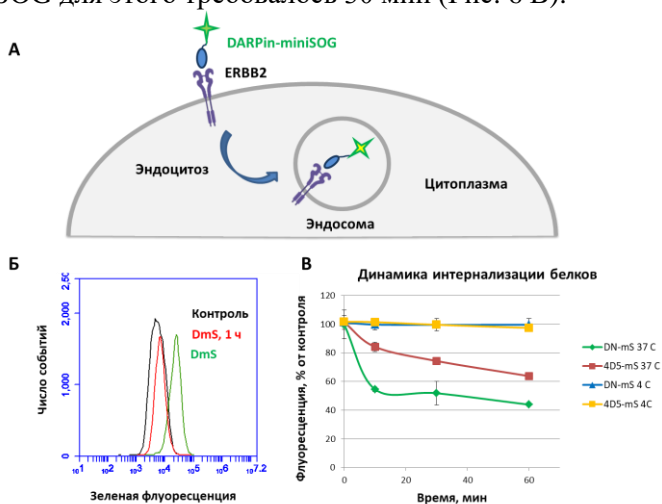


**Рисунок 5.** Гибель клеток под действием света в присутствии DARPIn-miniSOG происходит преимущественно по механизму некроза. **А.** Флуоресцентная микроскопия клеток SK-BR-3 через 1 ч после облучения синим светом в присутствии DARPIn-miniSOG, окраска клеток иодистым пропидием, наложение проходящего света и красной флуоресценции. Контроль – клетки SK-BR-3, инкубированные в темноте, в качестве положительного контроля апоптоза использовали клетки SK-BR-3, инкубированные в течение суток в среде с добавлением 20 мкМ CaCl<sub>2</sub>, DARPIn-miniSOG – клетки, облученные в течение 30 мин синим светом в присутствии DARPIn-miniSOG. **Б.** Проточная цитофлуориметрия клеток SK-BR-3, доля клеток и постклеточных элементов с гиподиплоидным содержанием ДНК обозначена на гистограммах.

### 3.2. Интернализация DARPIn-miniSOG в комплексе с рецептором ERBB2

Нами было установлено, что при близких значениях констант связывания с ERBB2 белков DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG, измеренных методом поверхностного плазмонного резонанса, их специфическая токсичность в отношении ERBB2-положительных клеток

отличается в 5 раз. Поскольку гибель клеток происходит по механизму некроза с повреждением плазматической мембраны, было выказано предположение, что меньшая специфическая цитотоксичность DARPin-miniSOG по сравнению с 4D5scFv-miniSOG связана с тем, что DARPin 9-29 способствует более быстрой рецептор-опосредованной интернализации ERBB2, чем 4D5scFv. Спектральные свойства miniSOG позволяют детектировать его интернализацию напрямую по снижению интенсивности флуоресценции, поэтому динамика интернализации 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG была изучена при помощи проточной цитофлуориметрии (Рис. 6А, Б). Эти измерения подтвердили гипотезу о разной скорости интернализации: падение флуоресцентного сигнала в 2 раза в случае DARPin-miniSOG достигалось за 10 мин, тогда как в случае 4D5scFv-miniSOG для этого требовалось 30 мин (Рис. 6 В).



**Рисунок 6.** Рецептор-опосредованная интернализация адресных фототоксинов в опухолевые клетки. **А.** Схема рецептор-опосредованной интернализации DARPin-miniSOG в комплексе с рецептором ERBB2. **Б.** Проточная цитофлуориметрия клеток SK-BR-3, окрашенных белком DARPin-miniSOG (DmS) и клеток SK-BR-3, окрашенных DARPin-miniSOG и проинкубированных при 37°C в течение 1 ч (DmS, 1 ч); контроль – неокрашенные клетки SK-BR-3. **В.** Динамика изменения флуоресценции клеток, окрашенных адресными белками DARPin-miniSOG (DN-mS) и 4D5scFv-miniSOG (4D5-mS) в условиях инкубации при 4°C (интернализация отсутствует; пробы DN-mS 4C, 4D5-mS 4C) и при 37°C (рецептор-опосредованная интернализация белков в комплексе с ERBB2; DN-mS 37°C, 4D5-mS 37°C).

Вероятнее всего, быстрая интернализация снижает токсичность адресного белка из-за того, что преимущественным механизмом

токсичности DARPin-miniSOG является реализуемый через повреждение плазматической мембраны некроз, при этом быстрый уход фототоксина в цитоплазму уменьшает этот эффект. Однако быстрая интернализация может влиять и на активность самого модуля miniSOG из-за процессов, происходящих в мембранных компартментах клеток. Причины угасания его флуоресценции при попадании в клетку было интересно выяснить, поскольку miniSOG можно использовать как генетически кодируемый фототоксин, нарабатываемый в разных компартментах клеток-мишеней. Для этого были смоделированы процессы, происходящие в эндосоме и цитоплазме клеток и способные влиять на интенсивность флуоресценции: протеолиз белка, протонирование кофактора и восстановление кофактора. Было установлено, что все эти факторы оказывают незначительное, влияние на флуоресценцию белка DARPin-miniSOG в пределах физиологических значений указанных параметров, а решающий вклад в падение интенсивности флуоресценции вносит экранирование флуорофора и поглощение его флуоресценции хромофорами клетки, такими как цитохромы.

Таким образом, было установлено, что DARPin 9-29 является менее эффективным адресным модулем для доставки фототоксина miniSOG к раковым клеткам, чем 4D5scFv, из-за большей скорости интернализации. В то же время, поскольку DARPin 9-29 обуславливает быструю интернализацию рецептора, он может оказаться перспективным партнером для доставки токсинов, механизм работы которых требует попадания в эндосому. В настоящей работе это было проверено на примере адресных противораковых белков, включающих фрагменты экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*.

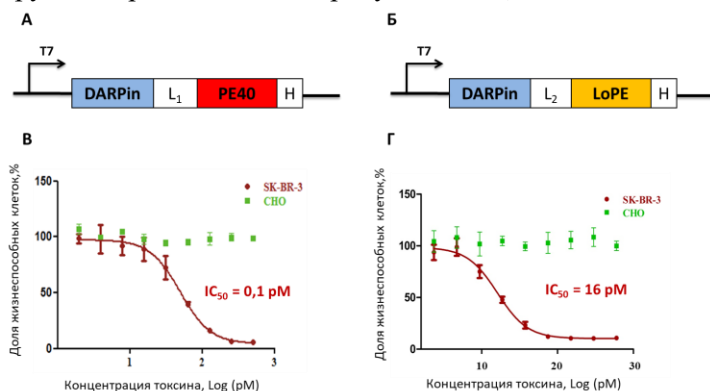
#### **4. Применение DARPin 9-29 в качестве адресного модуля для направленной доставки фрагментов экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* к опухолевым клеткам**

Экзотоксин А *P. aeruginosa* является одним из наиболее эффективных белковых токсинов за счет ферментативной активности, угнетающей трансляцию. Он состоит из адресного домена, связывающегося с рецептором-мишенью на поверхности клетки и вызывающего его интернализацию, последовательностей, обеспечивающих внутриклеточный транспорт, и каталитического домена. Модульная структура этого белка позволяет использовать его укороченные варианты и доставлять токсин к раковым клеткам. Адресному агенту на основе укороченных фрагментов экзотоксина А достаточно проникнуть в эндосому, где эффекторный модуль отрезается эндосомальной протеазой. Затем каталитический домен

при помощи сигнала ретроградного транспорта KDEL транспортируется в эндоплазматический ретикулум, откуда высвобождается в цитозоль, где АДФ-рибозилирует фактор элонгации трансляции eEF2, что приводит к нарушению синтеза белка и гибели клетки. Поскольку DARPIn 9-29 в составе рекомбинантных белков обеспечивает их связывание с ERBB2 и быструю интернализацию в комплексе с рецептором, мы предположили, что этот адресный модуль хорошо подходит для доставки фрагментов экзотоксина к раковым клеткам.

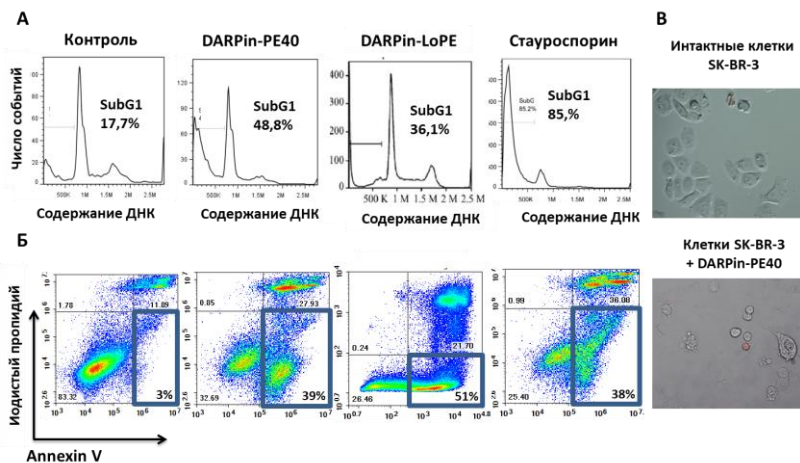
#### 4.1. Получение адресных токсинов DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE и исследование их специфического цитотоксического действия на ERBB2-положительные клетки.

Для исследования использовались два варианта рекомбинантных белков на основе DARPIn 9-29: DARPIn-PE40, содержащий фрагмент экзотоксина А *P. aeruginosa* массой 40 кДа, и DARPIn-LoPE с удаленными или мутированными иммунодоминантными эпитопами экзотоксина (схемы конструкций представлены на рисунке 7А, Б).



**Рисунок 7.** Специфическая цитотоксичность рекомбинантных адресных белков на основе экзотоксина А и DARPIn 9-29. **А.** Схема генетической конструкции DARPIn-PE40: показаны промотор РНК-полимеразы фага Т7, кодирующие последовательности DARPIn 9-29, гибкий линкер (L<sub>1</sub>) из шарнирного региона Н-цепи IgG3 мыши, фрагмент экзотоксина А *P. aeruginosa* массой 40 кДа (PE40) и His<sub>6</sub>-последовательность (Н). **Б.** Схема генетической конструкции DARPIn-LoPE: показаны последовательности, кодирующие укороченный линкер с пониженной иммуногенностью (L<sub>2</sub>), фрагмент экзотоксина А *P. aeruginosa* со сниженной иммуногенностью (LoPE). **В, Г.** Графики измеренной методом МТТ зависимости жизнеспособности клеток в зависимости от концентрации адресных токсинов DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE: SK-BR-3 – клетки аденокарциномы молочной железы, CHO – клетки яичника китайского хомячка (отрицательный контроль).

Белки были наработаны в цитоплазме *E. coli* и очищены никель-аффинной и ионообменной хроматографией. 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. Специфическую цитотоксичность адресных токсинов оценивали методом МТТ-теста: опухолевые клетки SK-BR-3 инкубировали в полной питательной среде с добавлением DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE в течение 72 ч, после чего оценивали их жизнеспособность. Было установлено, что оба белка проявляют специфическую цитотоксичность в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих клеток *in vitro* (рисунок 7В, Г): IC<sub>50</sub> для клеток SK-BR-3 составила 0,1 пМ для DARPIn-PE40 и 16 пМ для DARPIn-LoPE.



**Рисунок 8.** Гибель ERBB2-положительных клеток при воздействии адресных токсинов на основе DARPIn 9-29 и фрагментов псевдомонадного экзотоксина А происходит преимущественно по механизму апоптоза. **А.** Проточная цитофлуориметрия ERBB2-положительных клеток SK-BR-3 без инкубации с адресными токсинами (контроль), клеток, инкубированных с 10 нМ DARPIn-PE40 (DARPIn-PE40), с 50 нМ DARPIn-LoPE (DARPIn-LoPE) и с 5 мкМ стауроспорином (положительный контроль апоптоза). Показана доля клеток и постклеточных элементов с гиподиплоидным содержанием ДНК (SubG<sub>1</sub>). **Б.** Проточная цитофлуориметрия ERBB2-положительных клеток SK-BR-3 без инкубации с адресными токсинами (контроль), клеток, инкубированных с 10 нМ DARPIn-PE40 (DARPIn-PE40), с 50 нМ DARPIn-LoPE (DARPIn-LoPE) и с 5 мкМ стауроспорином (положительный контроль апоптоза); двойное окрашивание клеток аннексином V, конъюгированным с FITC и иодистым пропидием. **В.** Флуоресцентная микроскопия клеток линии SK-BR-3, инкубированных с белком DARPIn-PE40; наложение проходящего света и флуоресценции иодистого пропидия.

Ожидаемым механизмом клеточной гибели при воздействии псевдомонадного экзотоксина является апоптоз, для обоих белков был подтвержден именно этот путь. На апоптоз указывают морфология клеток (Рис. 8В) фрагментация ДНК (Рис. 8А) и ранняя экспозиция фосфатидилсерина на плазматической мембране (Рис. 8Б), определенные при помощи проточной цитофлуориметрии.

#### **4.2. Противораковая активность и неспецифическая токсичность DARPin-PE40 и DARPin-LoPE *in vivo***

Для экспериментов на животных белки DARPin-PE40 и DARPin-LoPE дополнительно очищали от липополисахаридов на колонке с полимиксином В. Противоопухолевую активность белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE исследовали *in vivo* на ксенографтных моделях опухолей привитых бестимусным мышам линии BALB/c, работа была выполнена в Лаборатории оптической тераностики Нижегородского государственного университета имени Н.И. Лобачевского.

DARPin-PE40 внутривенно вводили мышам с подкожно привитыми клетками линии SK-BR-3, объем опухолей оценивали по длине и ширине опухолевого узла. Было показано, что DARPin-PE40 в количестве 4 инъекций по 20 мкг белка достоверно снижает скорость роста опухоли, причем рост опухоли не ускоряется после прекращения введения белка.

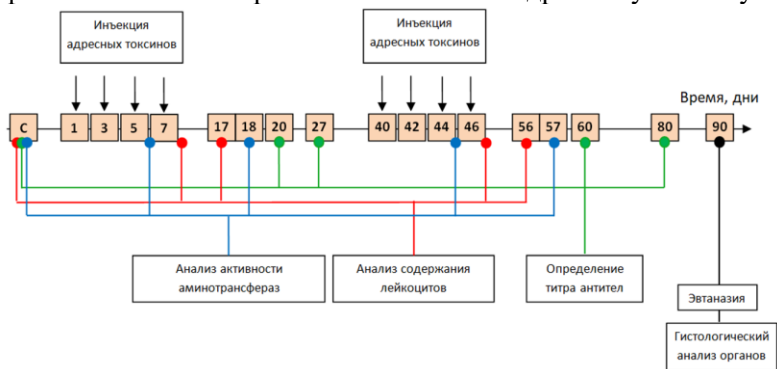
DARPin-LoPE был протестирован на ортотопической модели метастазов рака яичника в брюшной полости: бестимусным мышам вводили суспензию флуоресцентных ERBB2-положительных клеток SKOVip-kat, рост опухоли оценивали по флуоресцентному сигналу методом визуализации *in vivo*. Адресный белок DARPin-LoPE вводили внутрибрюшинно, поскольку известно, что для интраперитонеальных метастазов такое введение противораковых препаратов предпочтительно. Было показано, что курс из 5 инъекций DARPin-LoPE по 10 мкг (50 мкг суммарно) достоверно снижает скорость роста опухоли.

Практически важной характеристикой терапевтических молекул является их неспецифическая токсичность, поскольку обычно эти молекулы способны вызывать различные побочные эффекты. Так, для производных псевдомонадного экзотоксина А в разных исследованиях описаны гепатотоксичность, нефротоксичность и повышение проницаемости сосудов. Кроме того, будучи белком бактериального происхождения, псевдомонадный экзотоксин А обладает высокой иммуногенностью: преобладающие антитела к нему обнаруживаются у здоровых людей и лабораторных мышей, и введение белка с терапевтическими целями, как правило, вызывает эффективное



образование антител с последующими реакциями на инъекции вплоть до анафилактического шока. Вариант LoPE экзотоксина А, использованный в настоящей работе, был создан в результате удаления или внесения мутаций в иммунодоминантные эпитопы PE38, производного PE40. Важно отметить, что большинство измененных эпитопов совпадают для человека и мышей линии BALB/c, что позволяет использовать эту линию мышей для исследований иммуногенности белков на основе экзотоксина А, специфичных к раковым антигенам человека.

Сравнение общей токсичности и иммуногенности белков DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE проводили на здоровых иммунокомпетентных мышках линии BALB/c. Белки вводили двумя курсами по 4 инъекции через день (Рис. 9). DARPIn-PE40 вводили в количестве 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). Дозировки были выбраны исходя из данных о максимальной противораковой активности DARPIn-PE40 при общей дозе 80 мкг на животное. Вторые курсы инъекций проводили для моделирования повторного курса лечения, часто потенциально опасного или неэффективного из-за образования антител к адресному токсину.

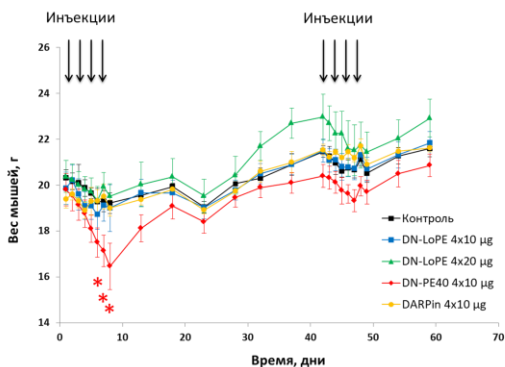


**Рисунок 9.** Схема исследования неспецифической токсичности и иммуногенности адресных токсинов DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE. Буквой «С» обозначен анализ исследуемых параметров у животных до начала курса инъекций адресных токсинов. Стрелками обозначены дни инъекций адресных токсинов.

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 (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови на 6 и 18 дни после начала каждого курса.

Иммуногенность адресных токсинов оценивали по титру специфических к исследуемому белку антител спустя 2 и 3 недели с момента окончания первого курса инъекций и спустя 2 и 5 недель с момента окончания второго курса инъекций. В конце эксперимента животных эвтаназировали и проводили гистологическое исследование внутренних органов.

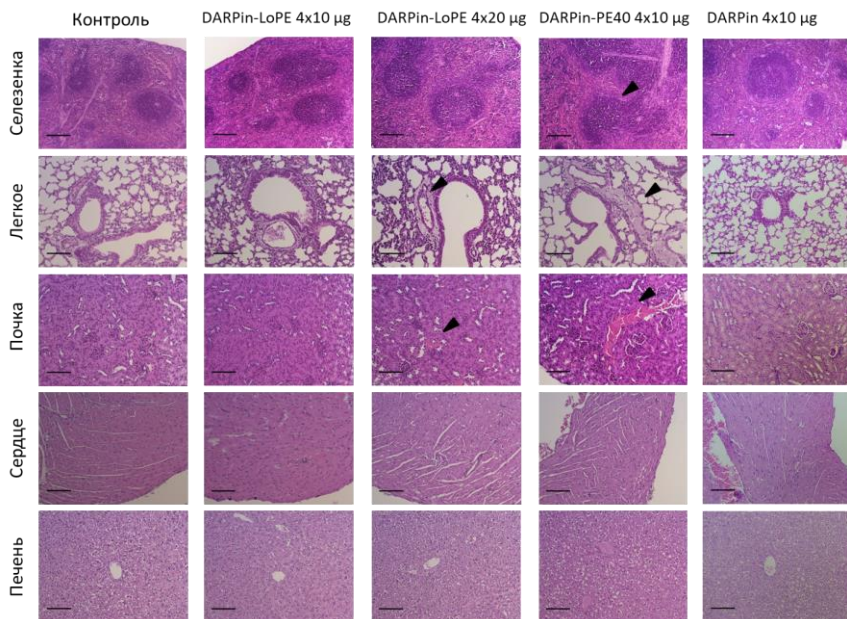
Показано, что первый курс инъекций адресного токсина DARPIn-PE40 в дозе «4x10» мкг (40 мкг за курс) приводит к значительному снижению веса животных по сравнению с контрольной группой и мышами, получавшими адресный токсин DARPIn-LoPE как в той же дозе («4x10» мкг), так и в дозе, вдвое большей («4x20» мкг) (Рис. 10). 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 имел 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 10.** Динамика веса тела мышей (среднее± ошибка среднего). Контроль – мыши, получавшие инъекции фосфатно-солевого буфера; 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). 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 9-29, 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 11.** Гистологическое исследование органов мышей, окраска гематоксилином и эозином. Патологические изменения выделены стрелками. У мышей, получавших  $4 \times 10$  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  $4 \times 10$  мкг DARPin-PE40 и  $4 \times 20$  мкг DARPin-LoPE за курс, перибронховаскулярное пространство расширено, в почках наблюдали кровотечения и очаги некроза. Масштабный отрезок соответствует 200 мкм в случае селезенки и 100 мкм для остальных органов.

Токсичность адресных агентов оценивали на основе патоморфологического анализа органов *post mortem*. Было показано, что строение селезенки у мышей, получавших два курса инъекций DARPin-LoPE в обеих дозировках (по  $4 \times 10$  мкг и по  $4 \times 20$  мкг за курс), не отличается от контроля. В случае мышей, получавших инъекции DARPin-PE40 в той же дозе ( $4 \times 10$  мкг за курс), в селезенке наблюдали изменения

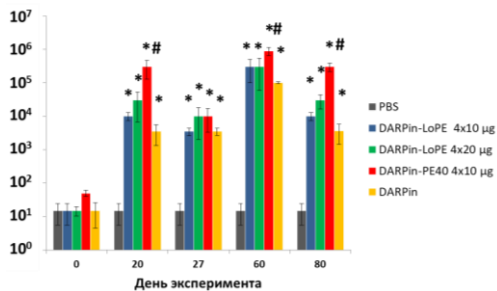
белой пульпы, а именно, умеренную гиперплазию белой пульпы как в виде отдельных фолликулов, так и в зоне периартериальных муфт, что свидетельствует о более сильном иммунном ответе (Рис. 11). В легких мышей, получавших 4x10 мкг DARPIn-PE40 за курс, наблюдали небольшое расширение перибронховаскулярного 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. Белок DARPIn-LoPE вызывает 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 наблюдали неравномерное кровенаполнение в мозговом веществе. При этом адресный токсин DARPIn-LoPE в той же дозе не влияет 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.

Для мониторинга возможных гепатотоксичности и кардиотоксичности измеряли активность в сыворотке крови АлАТ и АсАТ – ферментов, работающих в печени (АлАТ) и в сердце и скелетных мышцах (АсАТ). 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 АлАТ и АсАТ 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.

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

Иммуногенность белков оценивали по титру специфических антител в сыворотке мышей (Рис. 12). На 20 день после начала первого курса инъекций достоверное увеличение титра антител по сравнению с группой

мышей, получавших PBS, наблюдали во всех экспериментальных группах. Титр антител к DARPin-LoPE составил 1:10000 в группе мышей, получавших 4x10 мкг DARPin-LoPE и 1:30000 в группе мышей, получавших 4x20 мкг DARPin-LoPE. Самое значительное увеличение титра антител наблюдали в группе мышей, получавших 4x10 мкг DARPin-PE40, его значение достигло 1:300000.



**Рисунок 12.** 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 µg – 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 µg» и «DARPin-LoPE 4×20 µg»)  $p < 0.05$  (Критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони).

На 27 день титр антител во всех группах животных, получавших белки, падает, достигая значений 1:3500 для группы DARPin-LoPE 4x10 мкг и 1:10000 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 1:300000, у мышей, получавших 4x10 мкг DARPin-PE40, титр составил 1:900000. Спустя 40 дней после начала второго курса инъекций (день 80) минимальным титром антител обладает группа животных, получавших 4x10 мкг DARPin-LoPE (1:10000), немного выше значения у группы, получавшей 4x20 мкг DARPin-LoPE (1:30000), и максимальный титр антител наблюдается у мышей из группы, получавшей 4x10мкг DARPin-PE40 (1:300000). Титр антител к DARPin 9-29 составил

1:3500 после первого курса инъекций, он вырос до значения 1:100000 спустя 40 дней после начала второго курса инъекций, однако через 20 дней вернулся к значению 1:3500.

Таким образом, показана более высокая иммуногенность DARPin-PE40 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.

## 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### 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 DArPin-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.