

На правах рукописи

Калиновский Даниэль Владиславович

**Создание иммуноконъюгатов для таргетной терапии
GD2-позитивных опухолей**

1.5.3 Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

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

Научный руководитель:

Холоденко Роман Васильевич, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Свитич Оксана Анатольевна, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова»

Киямова Рамзия Галлямовна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский Федеральный Университет

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Защита состоится 09.12.2026 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10, к.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

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



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ганглиозид GD2 является клинически валидированной мишенью в терапии злокачественных новообразований и часто характеризуется гиперэкспрессией в таких опухолях, как нейробластома, саркомы, глиомы, меланома и мелкоклеточный рак легкого. Его постнатальная экспрессия в здоровых клетках организма в основном ограничена центральной нервной системой, периферическими нейронами и меланоцитами кожи. На начало 2026 года три GD2-специфичных препарата – моноклональные антитела dinutuximab, dinutuximab beta и paixitamab – одобрены для терапии нейробластомы, третьего по частоте встречаемости рака у детей после лейкемии и опухолей головного мозга, на долю которого приходится около 15% случаев смертей детей от онкологических заболеваний. С 2022 года dinutuximab beta одобрен для применения в России. В то же время, и сегодня, при мультимодальной терапии, выживают лишь около 50% пациентов с нейробластомой высокого риска, и даже среди них многие страдают от тяжелых связанных с лечением осложнений.

Ряд альтернативных моноклональным антителам стратегий GD2-специфичной терапии, среди которых можно особо выделить конъюгаты антител с радиоизотопами и цитокинами, биспецифичные антитела активаторы Т-клеток, а также CAR Т-клеточную терапию, широко представлен в клинических исследованиях. При этом, работы по созданию анти-GD2 конъюгатов антител с низкомолекулярными лекарствами (antibody-drug conjugates, ADC) до недавнего времени были практически не представлены в литературе. Как класс противоопухолевых препаратов, ADC уже продемонстрировали высокую эффективность в терапии ряда опухолей. По состоянию на 2026 год, не менее 19 различных ADC одобрены для лечения злокачественных новообразований, причем большинство из них – за последние 10 лет. Более половины клинически одобренных ADC, а также большинство кандидатов активных клинических исследований предназначены для лечения именно солидных опухолей. Подобный фокус позволяет говорить о высоком потенциале ADC в терапии GD2-экспрессирующих опухолей, которые в основном являются солидными.

Использование фрагментов полноразмерных антител для создания конъюгатов фрагментов антител с лекарствами (fragment-drug conjugates, FDC) выступает одной из стратегий повышения терапевтической эффективности ADC. В то время как фрагменты антител уже используются в терапии рака, конъюгатам фрагментов антител с лекарствами только предстоит доказать свою значимость в качестве альтернативы ADC. Основным преимуществом фрагментов антител по сравнению с полноразмерными антителами в терапии солидных опухолей считается их более эффективное проникновение из кровеносных сосудов внутрь опухоли и более однородное распределение в опухоли, обусловленные в первую очередь их меньшим размером. Конъюгация с фрагментом антитела может обеспечить цитотоксическому препарату потенциально более высокое накопление в опухоли. Одновременно, многие фрагменты антител характеризуются значительно более коротким временем циркуляции в крови. Быстрое выведение из организма сокращает время, доступное фрагменту антитела с лекарством для попадания в опухоль, и в то же время оно может в некоторых случаях представлять преимущество FDC перед ADC, поскольку означает, что препарат характеризуется более широким терапевтическим окном, и имеется возможность повышать вводимую дозу при сохранении низкой токсичности по отношению к здоровым тканям.

Различные форматы GD2-специфичных фрагментов антител описаны в литературе в качестве потенциальных препаратов для терапии рака. В то же время, отсутствуют работы по изучению GD2-специфичных конъюгатов фрагментов антител с лекарствами.

Цель работы и задачи исследования

Цель работы: получение конъюгатов GD2-специфичных антител с лекарствами с использованием различных форматов антител и ингибиторов полимеризации тубулина, и сравнительный анализ их функциональных свойств в экспериментах *in vitro* и в мышинной модели рака.

Для достижения данной цели сформулирован ряд комплексных задач.

Задачи исследования:

1. Получить конъюгаты анти-GD2 антитела dinutuximab (ch14.18) с лекарствами класса ауристативов MMAE и MMAF с оптимизированной степенью пришивки лекарства к антителу и сохранением антиген-связывающих свойств. Проанализировать цитотоксическое действие полученных ADC в клеточных линиях с различной экспрессией ганглиозида GD2. В экспериментах *in vivo* провести анализ биораспределения и накопления ADC в опухоли в сравнении с родительским антителом, а также изучить противоопухолевую эффективность ADC в мышинной модели GD2-положительной меланомы.

2. Получить и проанализировать антиген-связывающие свойства и стабильность конъюгатов минибоди и scFv-фрагмента антитела dinutuximab с лекарствами MMAE и MMAF. Изучить цитотоксическое действие FDC в клеточных линиях с различной экспрессией ганглиозида GD2. В мышинной модели GD2-положительной меланомы провести сравнение биораспределения и накопления в опухоли минибоди и антитела dinutuximab, а также проанализировать противоопухолевые эффекты их конъюгатов с лекарствами.

3. Получить конъюгаты анти-GD2 scFv-фрагмента и лекарств класса майтанзиноидов DM1 и DM4 с использованием поливалентных молекул полиэтиленгликоля, изучить физико-химические и антиген-связывающие свойства данных пегилированных FDC, а также их цитотоксическое действие в опухолевых линиях с различной экспрессией GD2.

4. Проанализировать способность полученных в работе ADC индуцировать иммуногенную клеточную гибель в сингенной мышинной модели рака.

Научная новизна и практическая значимость работы

В работе проведены одни из первых исследований по созданию и анализу функциональной активности анти-GD2 конъюгатов антител с лекарствами. Впервые получен и охарактеризован ряд конъюгатов анти-GD2 фрагментов антител с лекарствами. Высокая противоопухолевая активность препаратов позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для таргетной терапии GD2-экспрессирующих опухолей человека.

Значимость проведенных в работе исследований обусловлена гиперэкспрессией ганглиозида GD2 в широком ряду агрессивных опухолей человека и недостаточной эффективностью имеющихся на сегодняшний день стратегий терапии данных опухолей. Трансляционная значимость работы дополнительно подтверждена тем фактом, что несколько публикаций по ее итогам процитированы в патенте фармацевтической компании Merck KGaA на оригинальный анти-GD2 ADC, который является первым и единственным на сегодня препаратом подобного класса, поступившим в клинические исследования у пациентов с саркомой мягких тканей и глиобластомой в 2024 году.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Получены конъюгаты анти-GD2 антитела ch14.18 с лекарствами MMAE и MMAF (ADC), характеризующиеся высоким связыванием с антигеном и демонстрирующие прямую зависимость цитотоксического действия *in vitro* от уровня экспрессии антигена на клетках. Среди проанализированных клеточных линий, конъюгат с MMAF более эффективен в клетках с гиперэкспрессией GD2, а конъюгат с MMAE проявляет более высокую активность в клетках экспрессирующих антиген на более низком уровне.
2. Анти-GD2 ADC сохраняют профиль биораспределения неконъюгированного антитела и эффективно и дозозависимо ингибируют рост опухолей в мышинной модели рака.
3. Анти-GD2 ADC способны индуцировать иммуногенную клеточную гибель в сингенной мышинной модели рака.
4. Получены конъюгаты анти-GD2 минибоди и scFv-фрагмента с лекарствами MMAE и MMAF (FDC), сохраняющие антиген-связывающие свойства исходных фрагментов антител. Оба формата проявляют селективную цитотоксичность в GD2-положительных линиях, однако эффекты конъюгатов на основе минибоди значительно превосходят эффекты конъюгатов на основе scFv за счет бивалентного связывания антигена и более высокой степени пришивки лекарства.
5. Анти-GD2 минибоди демонстрирует значительно более высокое соотношение «опухоль/кровь» в сравнении с антителом в мышинной модели рака, а FDC на его основе проявляют сильные противоопухолевые эффекты в мышах, эквивалентные эффектам ADC в аналогичной дозировке препарата.
6. Получены пегилированные конъюгаты анти-GD2 scFv-фрагмента с лекарствами DM1 и DM4, сохраняющие антиген-связывающие свойства scFv и проявляющие селективную цитотоксичность в отношении GD2-положительных клеток.

Публикации

По тематике диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах и 4 тезиса по материалам докладов конференций.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: the 46th Congress of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS) (2022, Лиссабон, Португалия); XXXIV и XXXV Зимние молодежные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2022 и 2023, Москва, Россия); VII Всероссийская Конференция «Фундаментальная гликобиология» (2025, Москва, Россия).

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 177 страницах печатного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы, список сокращений, а также список использованной литературы и приложения.

Работа содержит 35 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 425 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение и анализ функциональной активности *in vitro* конъюгатов полноразмерного антитела ch14.18 с лекарствами MMAE и MMAF

В работу было взято анти-GD2 антитело dinutuximab (далее используется альтернативное название ch14.18), полученное посредством экспрессии в клетках китайского хомячка CHO DG44 и очищенное в аффинной хроматографии с использованием белка G. Поскольку поставленная в работе задача заключалась в получении клинически релевантных анти-GD2 ADC, для конъюгации к ch14.18 были выбраны лекарства класса ауристатинов MMAE и MMAF, которые были конъюгированы к антителу со степенью пришивки лекарства (drug-antibody ratio, DAR), равной 4 – типичной для одобренных в терапии рака конъюгатов с лекарствами данного класса.

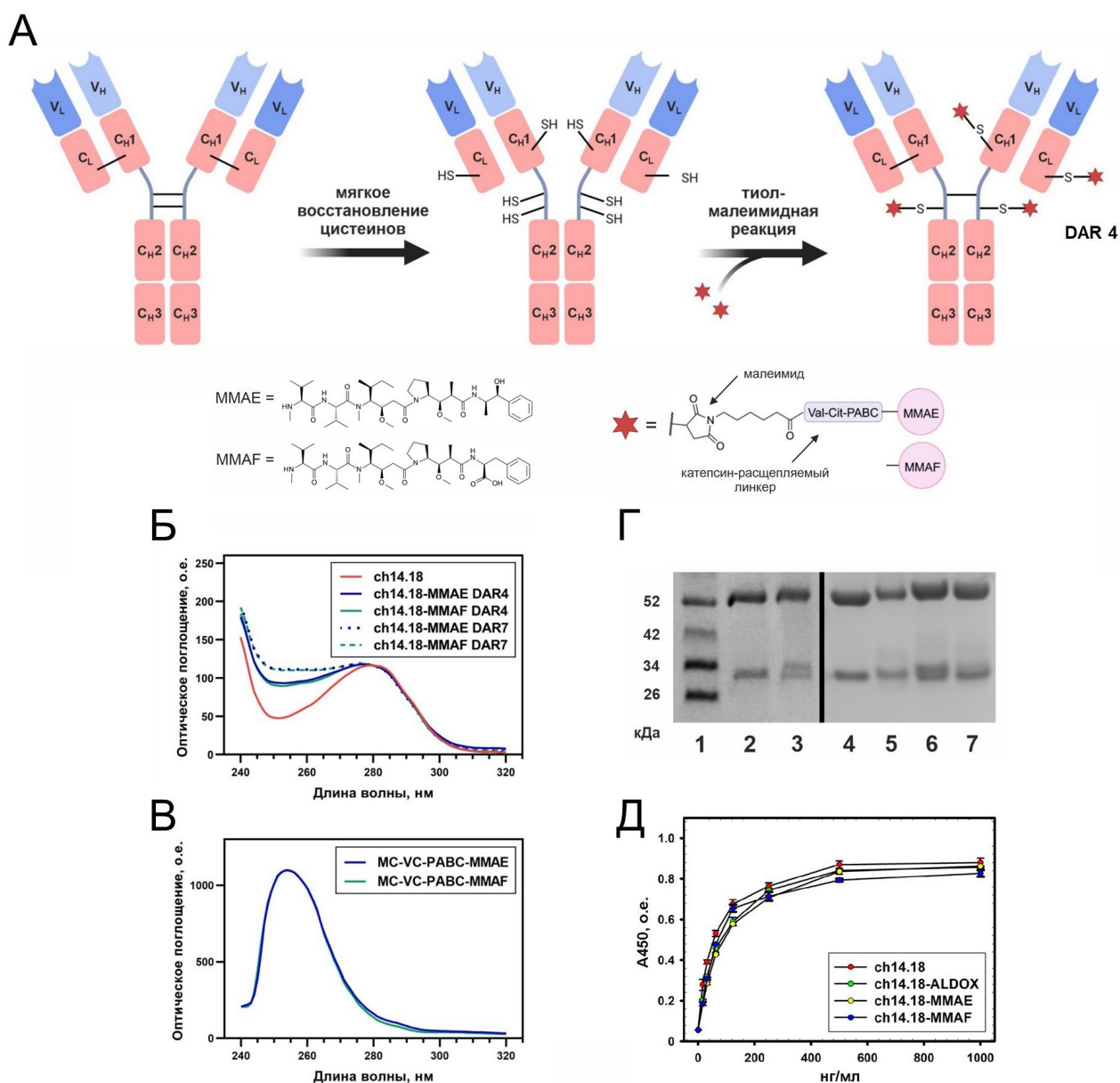


Рисунок 1. А. Схема реакции получения ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF. Б. Спектры ADC и родительского антитела ch14.18, нормированные на длине волны 280 нм. В. Спектры малеимид-активированных ауристатинов MMAE и MMAF. Г. Электрофорез в ПААГ в восстанавливающих условиях: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 и 4 – ch14.18; 3 и 6 – ch14.18-MMAE DAR 4; 5 – ch14.18-ALDOX DAR 4; 7 – ch14.18-MMAF DAR 4. Д. Прямой ИФА связывания ADC с сорбированным на подложке ганглиозидом GD2.

Для сайт-направленной конъюгации антитела с ауристатидами использована тиол-малеимидная реакция (**рисунок 1, А**). В работу взят расщепляемый maleimидный линкер на основе дипептида валин-цитруллин, благодаря которому после интернализации ADC в клетку и попадания в лизосомы лекарство высвобождается под влиянием протеолитического фермента катепсина В. Степень пришивки DAR для конъюгатов, полученных в оптимизированных условиях реакции, составила 4.4 ± 0.3 для ch14.18-MMAE и 4.1 ± 0.2 для ch14.18-MMAF (среднее \pm SEM, n=5 партий). Расчет DAR проводился по данным спектрофотометрического анализа ADC на наблюдаемых максимумах поглощения maleimид-активированных ауристатинов и антитела. Спектры поглощения ADC и лекарств представлены на **рисунке 1, Б и В**, соответственно. Кроме того, в идентичных условиях реакции были получены конъюгаты ch14.18 с maleimид-активированными доксорубицином (ch14.18-ALDOX) и флуоресцеином (ch14.18-FAM) с сопоставимой степенью пришивки, что косвенно валидирует методику расчета DAR.

ADC характеризовались высокой стабильностью и несколько увеличенной молекулярной массой легкой (молекулярная масса 25 кДа) и тяжелой (50 кДа) цепей относительно исходного антитела при разделении посредством гель-электрофореза в восстанавливающих условиях (**рисунок 1, Г**), что указывает на конъюгацию антитела с maleimид-активированными производными MMAE и MMAF (~1300 Да). Интересно, что легкая цепь ADC наблюдалась в геле в виде двух близкостоящих полос (ряды 3, 6 и 7 геля на рисунке), что демонстрирует одновременное присутствие как конъюгированных с лекарством, так и несвязанных с ним цепей. Важно отметить, что подобная гетерогенность ADC, получаемых в ходе сайт-направленной конъюгации лекарств по межцепочечным цистеинам антител, присуща всем клинически одобренным на сегодняшний день конъюгатам, несущим лекарства класса ауристатинов.

Конъюгация лекарств не повлияла на антиген-связывающие свойства антитела ch14.18. ADC продемонстрировали высокое связывание с ганглиозидом GD2 в ходе анализа в прямом ИФА, которое статистически не отличалось от антитела (**рисунок 1, Д**). Конъюгат ch14.18-FAM также эффективно связывал GD2-положительные, но не GD2-отрицательные опухолевые клеточные линии, что было показано посредством поверхностного окрашивания клеток в проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии.

В анализ цитотоксических эффектов ADC *in vitro* были взяты опухолевые линии с различной экспрессией ганглиозида GD2. В качестве ключевой пары линий для анализа эффектов всех полученных в работе конъюгатов были выбраны мышинные меланомы B78-D14 и B16. Основная причина выбора данной пары заключается в том, что меланома B78-D14 является производной GD2-отрицательной меланомы B16, модифицированной генами синтаз GM2/GD2 и GD3, и поэтому отличается от B16 конститутивной экспрессией GD2. Это делает данные линии адекватной парой для сравнения цитотоксических эффектов GD2-специфичных препаратов.

Конъюгаты ch14.18-MMAE и ch.14.18-MMAF с высокой эффективностью ингибировали жизнеспособность мышинных меланомы B78-D14 и Т-клеточной лимфомы EL-4, характеризующихся наиболее высокой экспрессией ганглиозида GD2 среди всех линий в работе и обозначенных в работе как гиперэкспрессирующие маркер (+++). Значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) для конъюгатов ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF составили 416 ± 22 пМ и 47 ± 2 пМ в линии меланомы B78-D14 и 258 ± 46 пМ и 70 ± 6 пМ в линии лимфомы EL-4, соответственно, в ходе анализа в МТТ-тесте (**рисунок 2, А и Б**).

В ходе анализа ch14.18-MMAE и ch.14.18-MMAF в панели клеточных линий с различной экспрессией GD2 наблюдалась прямая зависимость цитотоксического эффекта каждого из ADC от уровня антигена на клетках, а эффекты в GD2-отрицательных линиях отсутствовали. Корреляция между экспрессией ганглиозида GD2 на клетках и значениями IC50, полученными в МТТ-тесте при инкубации с ADC, представлена в тепловой карте на **рисунке 2, В**. Среди проанализированных линий, ch14.18-MMAF был более эффективен в линиях с гиперэкспрессией GD2, в то время как ch14.18-MMAE проявлял более выраженные эффекты в линиях, экспрессирующих GD2 на более низком уровне.

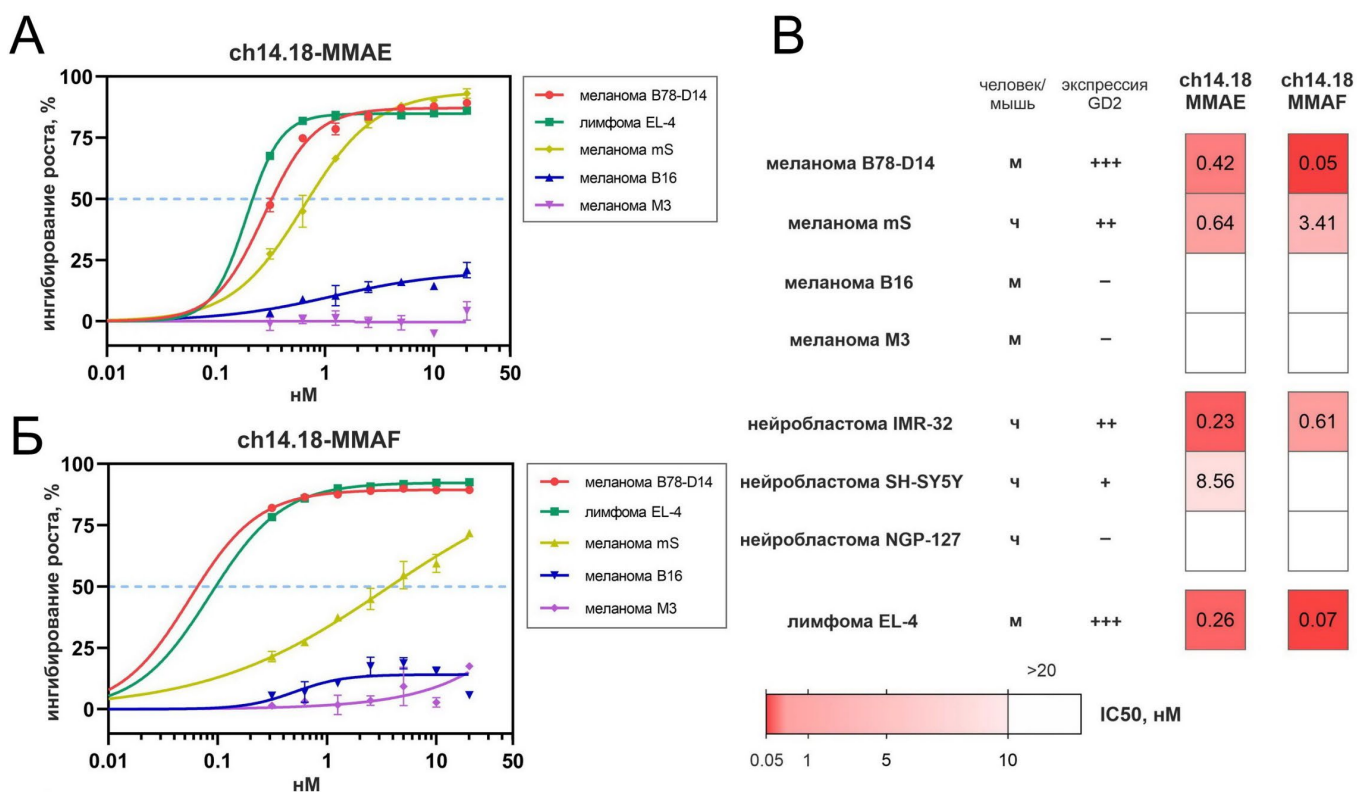


Рисунок 2. Цитотоксическая активность анти-GD2 ADC в опухолевых клеточных линиях. А-Б. Ингибирование роста линий с различной экспрессией ганглиозида GD2 проанализировано в MTT-тесте после 72 ч инкубации с конъюгатами ch14.18-MMAE (А) либо ch14.18-MMAF (Б). В. Тепловая карта корреляции между экспрессией GD2 в панели клеточных линий и значениями концентраций IC₅₀, полученными в MTT-тесте для конъюгатов ch14.18-MMAE либо ch14.18-MMAF. Линии дифференцированы по экспрессии маркера как гиперэкспрессирующие GD2 (+++), экспрессирующие GD2 на высоком (++) или низком (+) уровне, либо без экспрессии GD2 (-).

Вышеупомянутые различия между цитотоксической активностью анти-GD2 конъюгатов антител с лекарствами MMAE и MMAF вероятно опосредованы свойствами самих малых молекул. Лекарства структурно схожи (рисунок 1, А) и проявляют цитотоксическую активность посредством ареста клеточного цикла в фазе G₂/M, однако только MMAF несет заряженную в физиологических условиях терминальную фенилаланиновую группу, существенно снижающую его способность проникать через мембраны клеток, но позволяющую лекарству намного лучше накапливаться в антиген-позитивных клетках.

MMAE в состоянии легко проникать через клеточную мембрану, и, следовательно, может не только попадать в клетки-мишени в составе ADC в ходе антитело-зависимой интернализации, но и самостоятельно диффундировать в соседние антиген-негативные клетки, приводя к их опосредованной гибели – механизм, который несет название *bystander* эффект. Дополнительным фактором, способствующим уменьшению концентрации MMAE в антиген-экспрессирующих клетках, является то, что он, в отличие от MMAF, служит субстратом ряда белков множественной лекарственной резистентности – эффлюксных мембранных транспортеров, которые опухоли экспрессируют в ответ на терапию.

Таким образом, можно ожидать, что полученный в работе конъюгат анти-GD2 антитела с MMAF будет проявлять более сильные эффекты в терапии опухолей, характеризующихся высокой экспрессией GD2, тогда как конъюгат с MMAE окажется предпочтительнее для терапии опухолей с низкой либо гетерогенной экспрессией антигена.

2. Получение и анализ функциональной активности *in vitro* конъюгатов минибоди и scFv-фрагмента антитела с лекарствами MMAE и MMAF

Для создания конъюгатов фрагментов антител с лекарствами (FDC) использованы два ранее полученных анти-GD2 фрагмента – минибоди и scFv-фрагмент, которые несут переменные домены идентичные таковым у антитела dinutuximab.

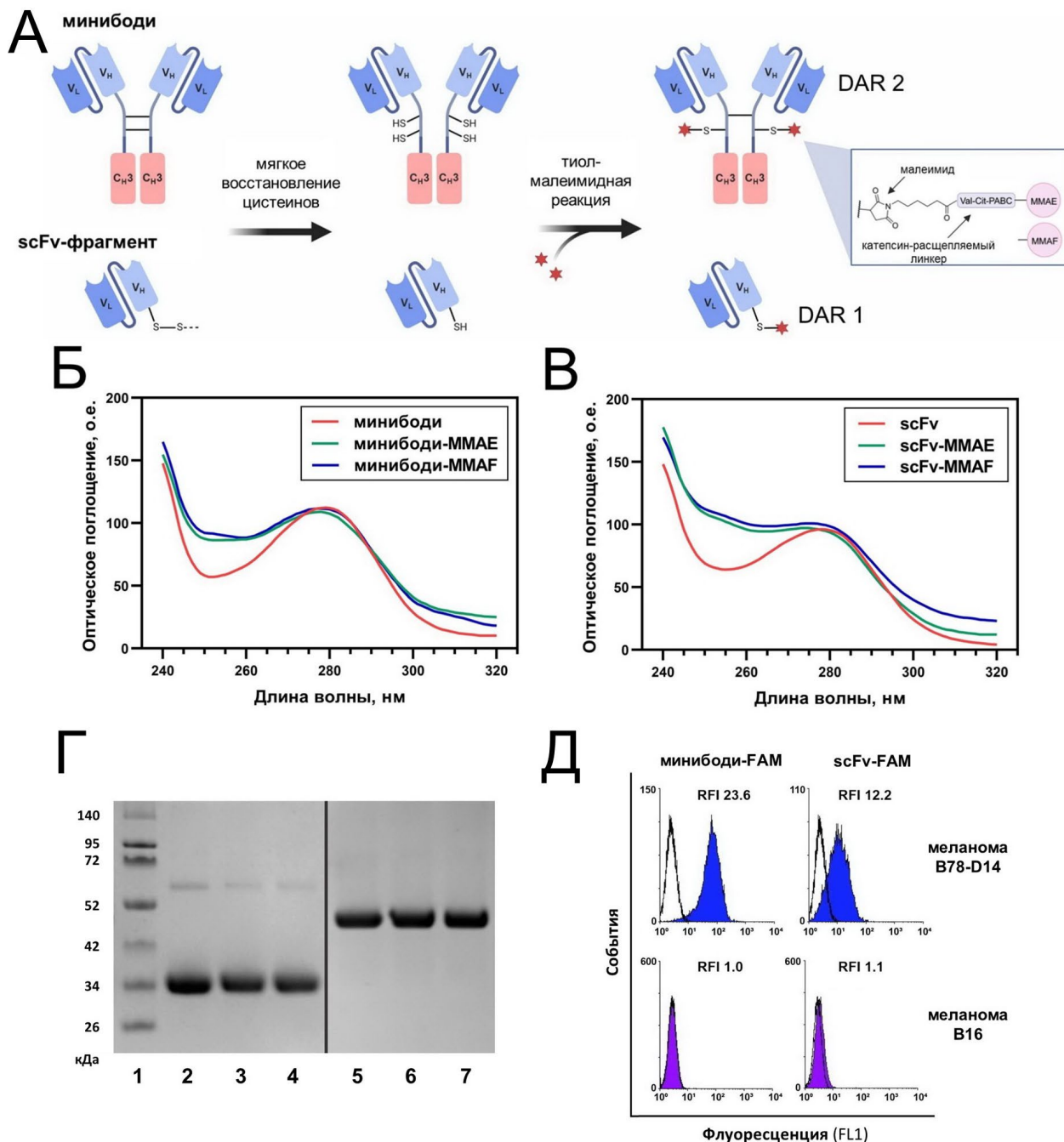


Рисунок 3. А. Схема реакций получения FDC. Б. Спектры минибоди-MMAE, минибоди-MMAF и неконъюгированного минибоди. В. Спектры конъюгатов scFv-MMAE, scFv-MMAF и неконъюгированного scFv. Г. Электрофорез в ПААГ в восстанавливающих условиях: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – scFv; 3 – scFv-MMAE; 4 – scFv-MMAF; 5 – минибоди; 6 – минибоди-MMAE; 7 – минибоди-MMAF. Д. Поверхностное окрашивание клеток конъюгатами минибоди-FAM и scFv-FAM в проточной цитофлуориметрии. Заполненные гистограммы – окрашивание конъюгатом, пустые – аутофлуоресценция неокрашенных клеток. RFI – относительная интенсивность флуоресценции.

Оба фрагмента были получены в линии клеток НЕК-293 и очищены в аффинной хроматографии с использованием белка L. Минибоди представляет собой гомодимер, включающий переменные домены антитела в ориентации V_L-V_H , а также шарнирный регион IgG1 и константный домен C_H3 антитела *dinutuximab*. ScFv-фрагмент включает переменные домены в той же ориентации, что и минибоди, а также октапептид FLAG-тэг (для детекции) и неспаренный цистеин на С-конце для сайт-направленной конъюгации с лекарством.

Анти-GD2 FDC были получены путем конъюгации тех же малеимид-активированных ингибиторов полимеризации тубулина MMAE или MMAF, которые использованы для получения ADC в главе выше, к межцепочечным цистеинам минибоди и к С-концевому цистеину scFv. Схема реакций представлена на **рисунке 3, А**. Условия реакции конъюгации минибоди с лекарствами были оптимизированы для получения FDC с наибольшей пришивкой лекарства к антителу которая не приводила бы к ухудшению стабильности и оказывала бы незначительное влияние на антиген-связывающие свойства. В оптимизированных условиях, минибоди-MMAE и минибоди-MMAF характеризовались степенью пришивки лекарства $DAR\ 2.0\pm 0.1$ и 2.1 ± 0.1 (среднее \pm SEM, $n=4$), соответственно. Условия реакции конъюгации scFv и лекарств были подобраны таким образом, чтобы обеспечить максимально полную конъюгацию С-концевого цистеина scFv с лекарством для получения пришивки близкой к $DAR\ 1$. Спектры поглощения конъюгатов представлены на **рисунках 3, Б и В**. Стабильность FDC была подтверждена посредством электрофореза в восстанавливающих условиях (**рисунок 3, Г**), где не наблюдалось значимой разницы между полосами конъюгатов и соответствующих неконъюгированных фрагментов. Также, с целью валидировать методику конъюгации, в идентичных условиях получены конъюгаты фрагментов антител с малеимид-активированным флуоресцеином (FAM), степень пришивки флуорофора в которых ориентировочно соответствовала DAR для конъюгатов аналогичных фрагментов антител с лекарствами.

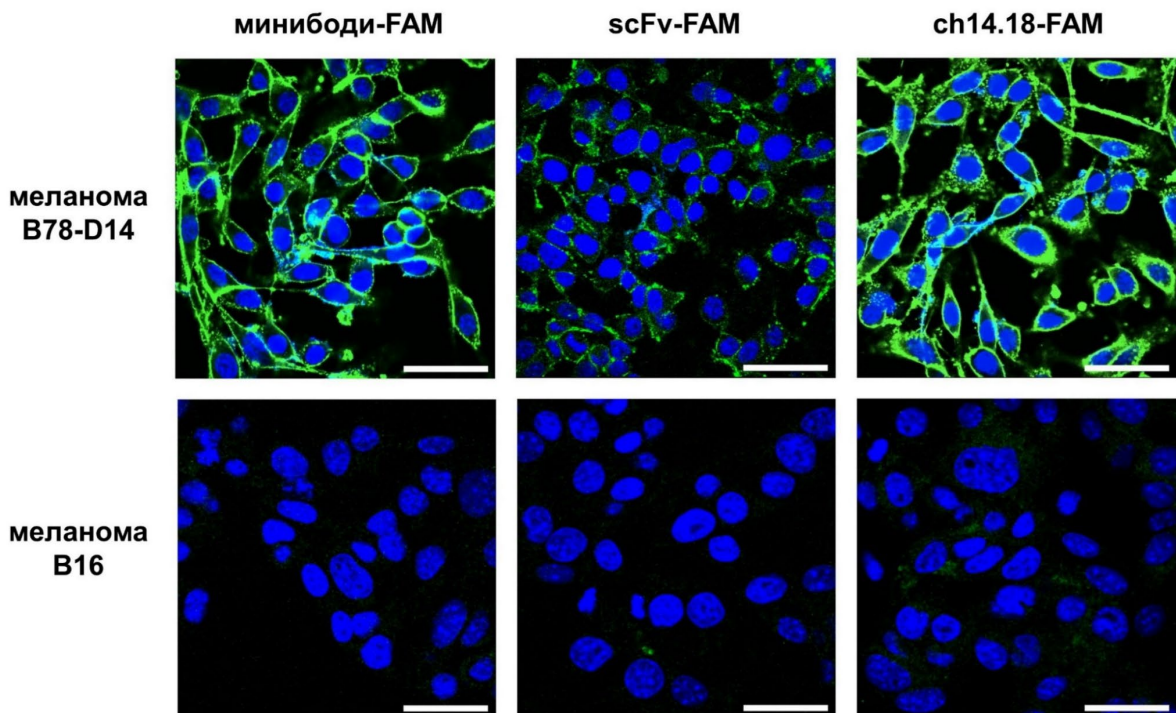


Рисунок 4. Поверхностное окрашивание GD2-положительной меланомы B78-D14 и GD2-отрицательной меланомы B16 конъюгатами минибоди-FAM, scFv-FAM и ch14.18-FAM в конфокальной микроскопии. Окрашивание анти-GD2 конъюгатами – зеленым цветом, окрашивание ядер клеток красителем Hoechst 33342 – синим цветом. Отрезок шкалы: 10 мкм.

Анализ связывания FDC обоих форматов с ганглиозидом GD2 в прямом ИФА показал, что они полностью сохраняют антиген-связывающие свойства исходных фрагментов антител. Связывание конъюгатов минибоди и scFv с малеимид-активированным флуоресцеином было

проанализировано в линиях GD2-отрицательной меланомы B16 и ее производной GD2-положительной меланомы B78-D14 методами проточной цитофлуориметрии (**рисунок 3, Д**) и конфокальной микроскопии (**рисунок 4**), при этом конъюгат минибоди связывал GD2-положительные клетки значимо выше в сравнении с конъюгатом scFv-фрагмента в обоих методических подходах.

Анализ цитотоксических эффектов конъюгатов минибоди и scFv-фрагмента с лекарствами MMAE и MMAF был проведен в клеточных линиях меланомы и нейробластомы с различной экспрессией GD2. В экспериментах в меланоме B78-D14 с гиперэкспрессией GD2, значения IC50 для минибоди-MMAE и scFv-MMAE составили 9.5 ± 0.7 нМ и 176.1 ± 5.3 нМ, тогда как значения для минибоди-MMAF и scFv-MMAF составили 1.9 ± 0.2 нМ и 17.4 ± 0.6 нМ, соответственно. Кривые ингибирования роста всех проанализированных линий для минибоди-MMAE и минибоди-MMAF представлены на рисунках **рисунок 5, А и Б**, соответственно; сводные данные по значениям IC50 для всех конъюгатов фрагментов антител с лекарствами сведены в тепловую карту на **рисунке 5, В**.

По результатам анализа цитотоксической активности FDC, эффекты конъюгатов минибоди с лекарствами в GD2-положительных линиях значительно превосходили эффекты конъюгатов scFv с лекарствами для обоих ауристативов, и эти различия были особенно заметны в клетках с гиперэкспрессией GD2. Это можно объяснить как более сильным связыванием минибоди с антигеном на клетках (наличие у минибоди двух антиген-связывающих доменов), так и более высокой нагрузкой минибоди лекарством (DAR 2 против DAR 1 для конъюгатов scFv-фрагмента).

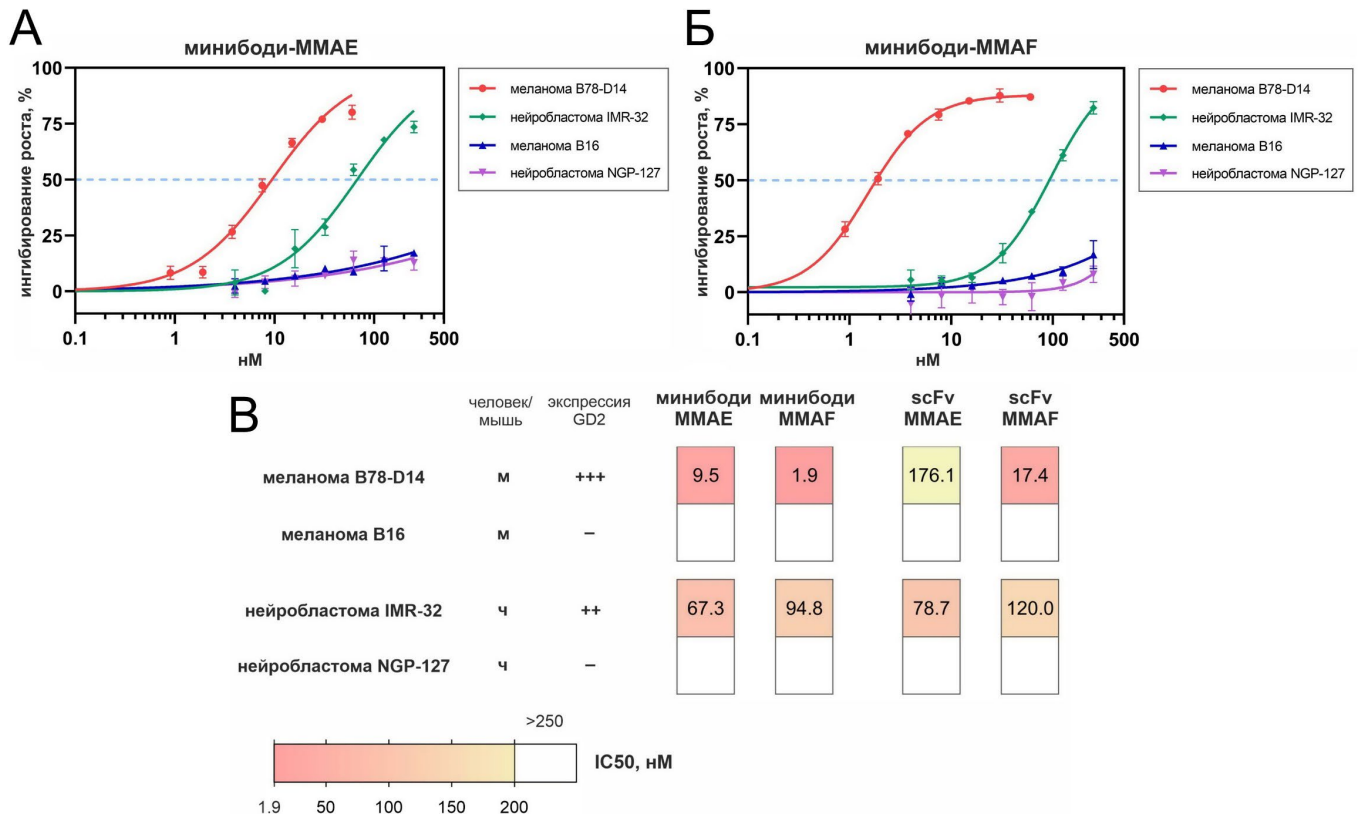


Рисунок 5. Цитотоксическая активность анти-GD2 FDC в опухолевых клеточных линиях. А-Б. Ингибирование роста линий проанализировано в МТТ-тесте после 72 ч инкубации с минибоди-MMAE (**А**) или минибоди-MMAF (**Б**). **В.** Тепловая карта корреляции между экспрессией ганглиозида GD2 и значениями IC50, полученными в МТТ-тесте после инкубации линий с FDC.

С использованием двух форматов фрагментов антител были подтверждены закономерности, наблюдаемые для анти-GD2 ADC несущих лекарства MMAE либо MMAF: конъюгаты минибоди и scFv с MMAE более эффективно ингибировали жизнеспособность линии

нейробластомы IMR-32 с высокой экспрессией GD2 (++) , в то время как конъюгаты с MMAF проявили более сильные эффекты в линии меланомы B78-D14 с гиперэкспрессией GD2 (+++). В то же время, цитотоксические эффекты анти-GD2 FDC в опухолевых линиях значительно уступали таковым для ADC с аналогичными лекарствами (но более высоким DAR 4). Так, цитотоксическая активность конъюгата минибоди-MMAF, который показал наиболее высокую эффективность среди всех FDC в линии меланомы B78-D14 с гиперэкспрессией GD2 ($IC_{50} = 1.9$ нМ), более чем в 10 раз уступала активности конъюгата ch14.18-MMAF в этой же линии.

3. Получение и анализ функциональной активности *in vitro* пегилированных конъюгатов scFv-фрагмента антитела с лекарствами DM1 и DM4.

Конъюгация белков с полиэтиленгликолем (ПЭГ) широко используется для увеличения их времени циркуляции *in vivo*, что особенно актуально для фрагментов антител, для которых этот параметр обычно сильно уступает полноразмерным антителам. ПЭГ также находит все большее распространение в задачах по улучшению гидрофильности линкеров в составе ADC.

В ранее проведенном в нашей лаборатории исследовании, молекулы ПЭГ, несущие несколько функциональных малеимидных групп, были использованы для создания мультимеров GD2-специфичного scFv-фрагмента антитела dinutuximab, которые характеризовались значительно более высокими временем циркуляции и накоплением в опухоли в мышинной модели рака в сравнении с интактным scFv. В данной работе, тетравалентный ПЭГ массой 10 кДа (далее обозначен как PEG4) был использован для одновременного введения в единую химическую конструкцию вышеупомянутого scFv и тиол-содержащих лекарств – майтанзиноидов DM1 либо DM4. Выбор тетравалентного ПЭГ призван получить конъюгаты scFv с лекарством с высоким DAR без потери стабильности фрагмента, а также увеличить его время циркуляции *in vivo*.

GD2-специфичные пегилированные FDC получены в двухстадийной тиол-малеимидной реакции, схема которой представлена на **рисунке 6, А**. Получение конъюгатов в ходе двухстадийной реакции обусловлено в первую очередь низкой растворимостью майтанзиноидов в водных растворах, которые были конъюгированы с PEG4 в водно-органической среде. На второй стадии промежуточные продукты реакции были конъюгированы с восстановленным концевым цистеином scFv-фрагмента, уже в отсутствие органического растворителя. Наконец, в ходе очистки пегилированных FDC посредством фильтрации и эксклюзионной хроматографии, из раствора были полностью удалены непрореагировавшие лекарства, а также частично удален непрореагировавший scFv-фрагмент.

Белковые продукты реакций анализировали посредством полиакриламидного гель-электрофореза. Пегилированные мономер и димер scFv-фрагмента с наблюдаемыми молекулярными массами 50 и 80 кДа соответственно составляли преобладающую часть белковых полос в ходе электрофоретического разделения FDC в восстанавливающих условиях, тогда как содержание в очищенных продуктах неконъюгированного scFv-фрагмента массой 27 кДа было невелико (**рисунок 6, Б**).

Степень пришивки майтанзиноидов к PEG4 в продуктах реакций конъюгации детектировали посредством спектрофотометрического анализа. Спектры продуктов реакции scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4, а также неконъюгированного scFv представлены на **рисунке 6, В**. Соотношение DM1 и DM4 к мономеру scFv в продуктах реакций составило 1.5 ± 0.2 и 1.6 ± 0.3 соответственно (среднее \pm SEM, n=3 партии). Эти соотношения не могут быть применены непосредственно для определения степени пришивки лекарства к антителу (DAR) в составе конъюгатов scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 по причине присутствия небольшого количества неконъюгированного scFv в конечном продукте, однако комплексная очистка FDC гарантирует, что все лекарство находится в составе конъюгата с scFv-фрагментом.

Совокупные данные гель-электрофореза и спектрофотометрического анализа пегилированных FDC позволяют дать приблизительную оценку их составу: в конъюгатах scFv-

PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 в среднем 1.5 молекулы scFv и 2.5 молекулы лекарства присоединены к тетравалентной молекуле ПЭГ.

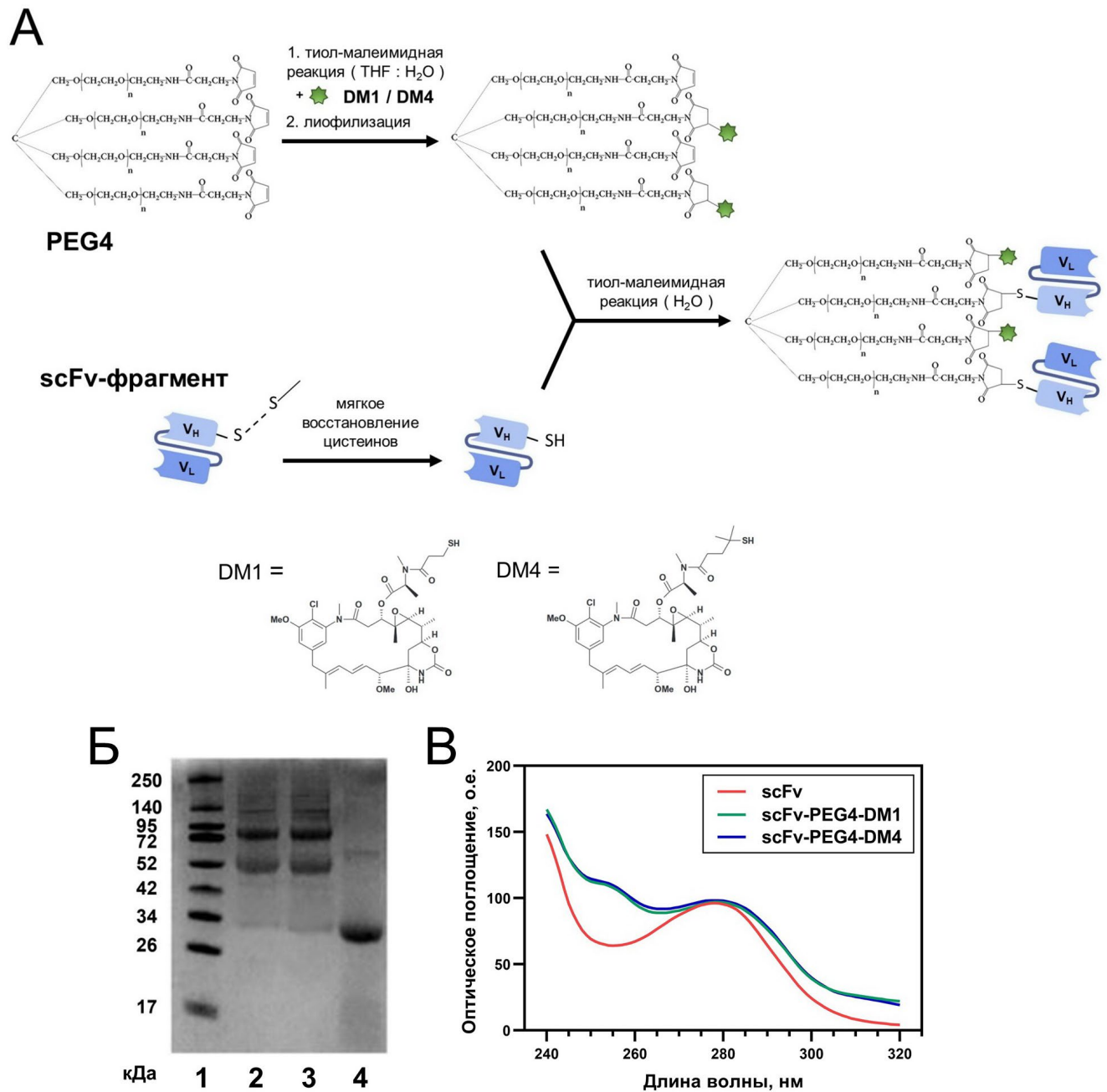


Рисунок 6. А. Схема реакции получения пегилированных конъюгатов scFv-фрагмента с лекарствами DM1 и DM4. **Б.** Электрофорез в ПААГ в восстанавливающих условиях: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – scFv-PEG4-DM1; 3 – scFv-PEG4-DM4; 4 – scFv. **В.** Спектры конъюгатов scFv-PEG4-DM1, scFv-PEG4-DM4 и scFv, нормированные на длине волны 280 нм. THF, тетрагидрофуран.

Анализ связывания конъюгатов scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 с сорбированным ганглиозидом GD2 и GD2-экспрессирующими опухолевыми клетками, проведенный посредством прямого ИФА и поверхностного окрашивания клеток в проточной цитофлуориметрии соответственно, показал, что пегилированные FDC характеризуются как минимум не уступающими родительскому scFv-фрагменту антиген-связывающими свойствами.

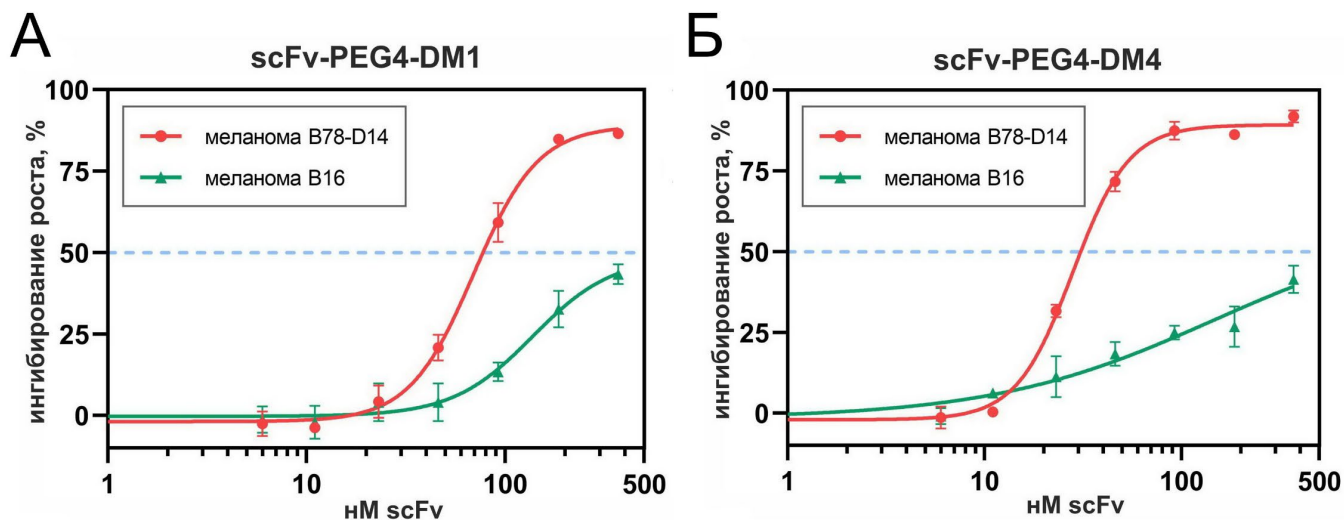


Рисунок 7. Цитотоксическая активность анти-GD2 негликозированных FDC в опухолевых клеточных линиях. Ингибирование роста линий проанализировано в MTT-тесте после 72 ч инкубации с конъюгатами scFv-PEG4-DM1 (А) или scFv-PEG4-DM4 (Б).

Пегелированные FDC scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 вызывали сильное ингибирование роста GD2-положительной линии клеток B78-D14, значительно отличающееся от эффектов в GD2-отрицательной линии B16, а значения IC₅₀ для конъюгатов scFv-PEG4-DM4 и scFv-PEG4-DM1 в клетках B78-D14 составили 33.1 ± 2.1 нМ и 82.3 ± 4.2 нМ, соответственно (рисунок 7). Цитотоксическая активность свободного DM4 была несколько более выражена в сравнении с DM1 в обеих проанализированных линиях меланомы. Так, значения IC₅₀, полученные при инкубации DM1 и DM4 с GD2-положительными клетками B78-D14, составили 3.7 ± 0.2 нМ и 2.7 ± 0.1 нМ, соответственно. Этим, вероятно, и объясняется в два раза более высокая цитотоксичность конъюгата scFv-PEG4-DM4 в сравнении с scFv-PEG4-DM1, наблюдаемая в данной GD2-экспрессирующей клеточной линии.

Более высокая цитотоксичность DM4 в сравнении с DM1 показана в литературе и обусловлена присутствием двух дополнительных метиловых групп на углероде, связанном с тиолом молекулы, которые экранируют заряд и увеличивают сравнительную липофильность DM4. Данный фактор позволяет DM4 (и его S-метилованному производному; майтанзиноиды в норме подвергаются реакциям тиол-дисульфидного обмена с тиол-содержащими соединениями как в культуре клеток, так и в организме) более эффективно проникать через клеточные мембраны в сравнении с DM1. Следовательно, оба майтанзиноида способны уничтожать антиген-негативные клетки после антитело-опосредованной интернализации и высвобождения в целевых клетках (*bystander* эффект), однако данный эффект более выражен для DM4.

Для использованного в работе анти-GD2 scFv-фрагмента в другой работе нашей лаборатории показано попадание в лизосомальные компартменты после интернализации в клетки меланомы B78-D14. Интернализация и процессинг scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4, полученных с использованием нерасщепляемого линкера, в антиген-экспрессирующих клетках по-видимому приводят к образованию двух ключевых метаболитов с тубулин-ингибирующей активностью: 1) свободные DM1/DM4, высвобождающиеся в результате глутатион-опосредованной ретро-реакции Михаэля в цитозоли, и 2) пегелированные майтанзиноиды PEG4-DM1/DM4, образующиеся в ходе лизосомального протеолиза scFv-фрагмента. Цепи полиэтиленгликоля подвергаются лишь незначительной деградации в клетках, а их конъюгаты с майтанзиноидами будут практически неспособны диффундировать через клеточные мембраны. Однако свободные DM1 и DM4 будут проявлять *bystander* эффект.

В работе продемонстрирована принципиальная возможность создания функционально активных пегелированных конъюгатов GD2-специфичных scFv-фрагментов антител с лекарствами. Несмотря на их специфичную активность *in vitro*, пегелированные FDC не были взяты в дальнейший анализ *in vivo* в рамках настоящей работы ввиду их относительно низкой активности в опухолевых клеточных линиях по сравнению с другими полученными анти-GD2 конъюгатами, а также ввиду сравнительной сложности их синтеза. В то же время, полученные пегелированные FDC могут обладать преимуществами в терапии как по сравнению с полноразмерными ADC, так и другими форматами FDC, обусловленными потенциально более эффективным проникновением данных молекул в солидные опухоли за счет их малого размера и одновременно длительного времени циркуляции в организме.

4. Противоопухолевая активность и биораспределение конъюгатов полноразмерного антитела с лекарствами в мышинной модели рака

Известно, что конъюгация антитела с лекарствами может в случае высокой степени пришивки лекарств сильно изменять профиль его биораспределения, приводя к агрегации и более быстрому выведению ADC из организма. Слишком быстрое выведение из организма негативно сказывается на накоплении ADC в опухоли, а слишком медленное приводит к повышенной системной токсичности и, как следствие, к уменьшению терапевтического окна препарата, обычно достаточно узкого даже для ADC с оптимальной степенью пришивки. По этой причине, перед тем как перейти к анализу противоопухолевой активности полученных в работе GD2-специфичных молекул в мышинной модели рака, представлялось важным изучить их накопление в опухоли и биораспределение в этой же модели.

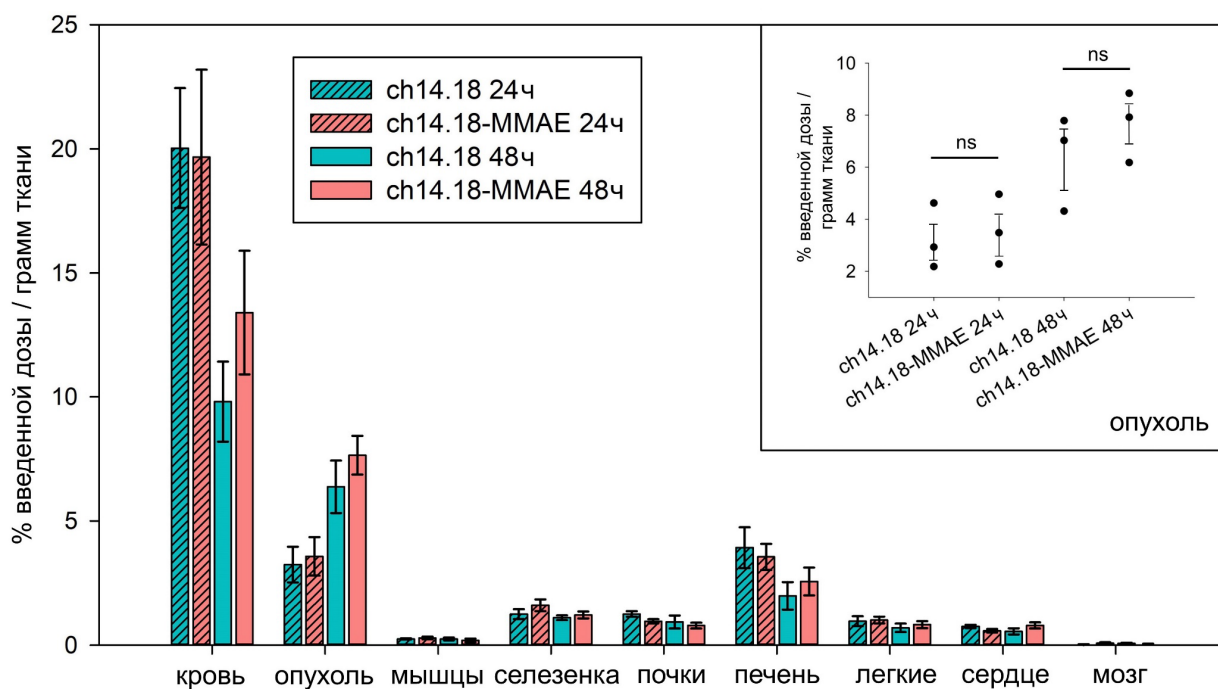


Рисунок 8. Биораспределение ADC ch14.18-MMAE и антитела ch14.18 через 24 ч и 48 ч после внутривенного введения в мышинной модели GD2-положительной меланомы. Во вкладке дополнительно представлена точечная диаграмма накопления в опухоли; ns, нет значимого отличия между группами, непарный t-тест. Данные представлены в виде процента введенной дозы в пересчете на грамм типа ткани или плазмы крови (% ID/g), и выражены как среднее \pm SEM для групп из 3 животных.

В анализ биораспределения ADC в сравнении с родительским антителом был взят конъюгат ch14.18-MMAE. Для создания *in vivo* модели здесь и в последующих экспериментах использована линия мышины меланомы B78-D14, конститутивно экспрессирующая ганглиозид GD2 на высоком уровне и формирующая сингенную модель в мышах линии C57BL/6. Мышам с подкожными опухолями меланомы внутривенно вводили ADC и антитело, флуоресцентно-меченные по аминок группам лизинов, а биораспределение в плазме крови и органах анализировали через 24 и 48 ч после инъекции.

Результаты анализа, представленные в виде процента введенной дозы на грамм соответствующей ткани, сведены в диаграмму на **рисунке 8**. Накопление ch14.18-MMAE в опухоли статистически значимо не отличалось от накопления антитела ch14.18 – содержание ADC и антитела в опухоли составляло 3.6% против 3.2% введенной дозы на грамм ткани (% ID/g) через 24 ч, соответственно, и увеличилось до 7.7% против 6.4% через 48 ч после введения препаратов, соответственно. Содержание ADC в плазме крови через 24 ч после введения составило 20% ID/g (или 16% исходно введенного препарата), а через 48 ч – 13% ID/g, что было также сравнимо со значениями для антитела.

Среди проанализированных органов мышей, обе молекулы в наибольшей степени и сопоставимо накапливались в печени, достигая значений в 5 % ID/g для отдельных мышей через 24 ч после инъекции. Накопление в печени представляет особый интерес для конъюгатов антител с лекарствами – ингибиторами полимеризации тубулина. Известно, что высокая степень пришивки лекарства (DAR>6) и связанная с ней повышенная гидрофобность ADC часто приводят к нежелательному увеличению накопления конъюгатов в печени и их ускоренному клиренсу. В данной работе были также получены конъюгаты ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF с повышенным DAR 7, которые характеризовались высокой стабильностью в растворе и превосходили ADC с DAR 4 по цитотоксической активности *in vitro* в GD2-экспрессирующих клеточных линиях, однако они не были взяты в эксперименты *in vivo*, поскольку для них ожидалась неоптимальные фармакокинетические параметры и повышенная системная токсичность.

По итогам эксперимента по анализу биораспределения ADC сделан вывод, что конъюгация антитела с лекарством с заданной степенью пришивки DAR не оказывает значимого влияния на его фармакокинетические свойства в выбранной модели *in vivo*.

* * *

Изучение противоопухолевой активности полученных анти-GD2 ADC в мышинной модели рака являлось одной из ключевых задач работы. Конъюгаты ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF со степенью пришивки лекарства к антителу DAR 4, введенные мышам в режиме 5 инъекций в дозировке 5 мг/кг массы, эффективно ингибировали рост опухолей GD2-положительной меланомы B78-D14 (**рисунк 9, А**). Ингибирование роста под действием ch14.18-MMAF было несколько более выражено, нежели в случае ch14.18-MMAE, однако значимого различия в размерах опухолей мышей обеих групп не наблюдалось. Так, при достижении опухолями группы контроля среднего объема ~1000 мм³ (день 42 анализа), коэффициент относительного торможения роста опухолей (% TPO) составил 66% для группы ch14.18-MMAE и 78% для группы ch14.18-MMAF.

В ходе гистологического окрашивания опухолей животных, полученных по окончании эксперимента, у мышей контрольной группы наблюдалась типичная архитектура солидных опухолей с ограниченными зонами спонтанного некроза, в то время как терапия конъюгатами ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF приводила к образованию крупных некротических зон вокруг кровеносных сосудов опухолей. Эффект ch14.18-MMAF был более очевиден из-за более выраженных некротических зон, что коррелировало с более сильным ингибированием роста опухолей под действием данного препарата.

Важно отметить, что несмотря на использование иммунокомпетентной мышинной модели, которая позволяет детектировать противоопухолевые эффекты химерного антитела ch14.18 – как прямую клеточную гибель, так и эффекты, вызванные иммуноассоциированными механизмами

(таких как антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, ADCC, и комплемент-опосредованная цитотоксичность, СМС), статистически достоверных различий в росте опухолей группы контроля и группы, которой вводили ch14.18, обнаружено не было.

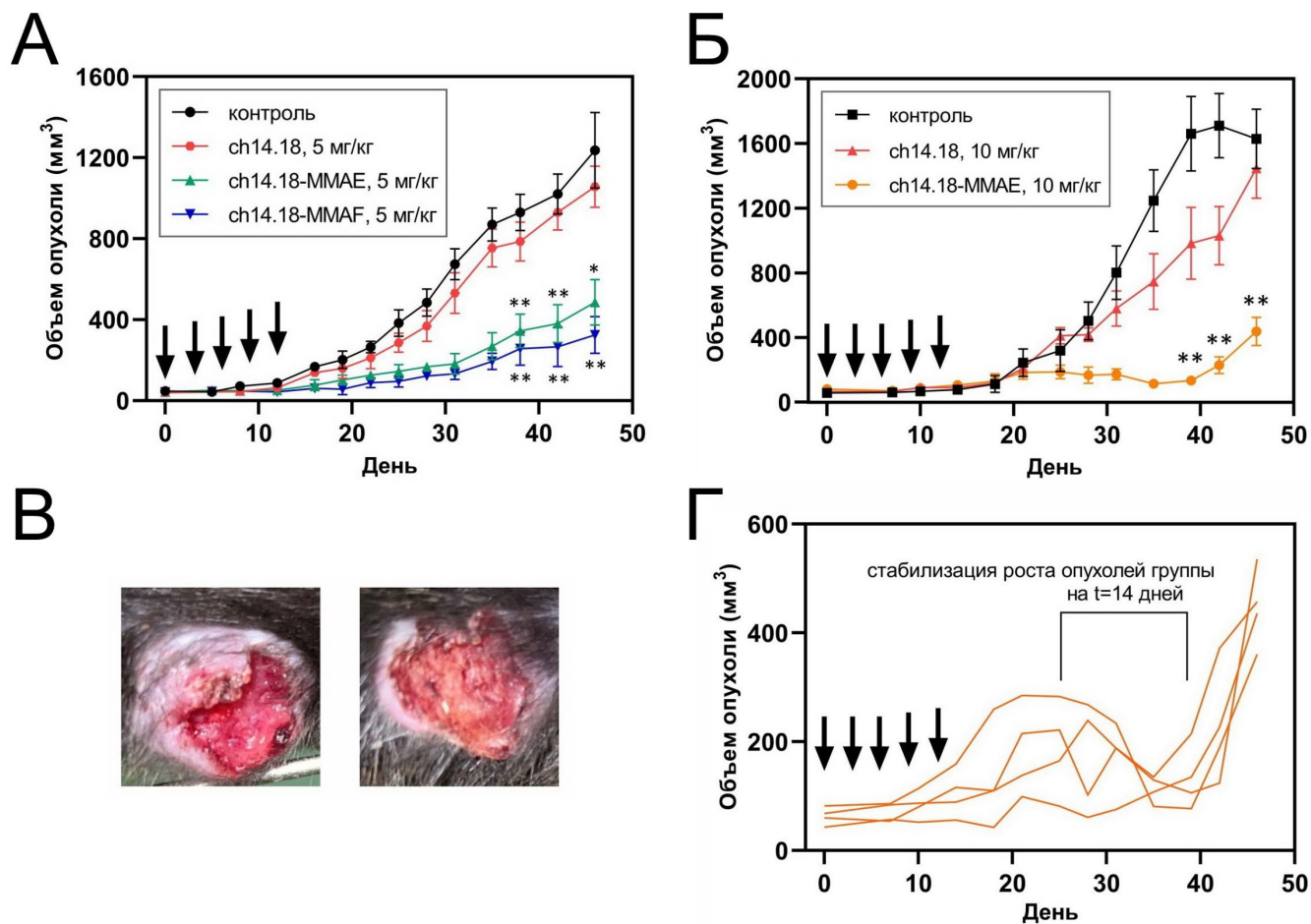


Рисунок 9. Противоопухолевая активность ADC в мышинной модели GD2-положительной меланомы B78-D14 **А.** Динамика роста опухолей при введении ADC в дозе 5 мг/кг массы тела. **Б.** Динамика роста опухолей при введении ADC в дозе 10 мг/кг массы тела. **В.** Опухоли мышей группы ch14.18-MMAE, 10 мг/кг, некроз опухолевой ткани на день 35 анализа. **Г.** Индивидуальные кривые динамики роста опухолей мышей группы ch14.18-MMAE, 10 мг/кг. Дни введения препаратов указаны стрелками. Значения представлены как среднее \pm SEM для групп из 4 животных. *, $P < 0.05$ в сравнении с группой контроля; **, $P < 0.01$ в сравнении с группой контроля; непарный t -тест.

Далее был проведен анализ с использованием ch14.18-MMAE со степенью пришивки DAR 4 в повышенной дозе 10 мг/кг массы тела и при аналогичном режиме введения, результаты которого представлены на **рисунке 9, Б**. Увеличение дозы обеспечило значительно более выраженное ингибирование роста опухолей по сравнению с обоими ADC в дозе 5 мг/кг. Только в группе данного эксперимента, получавшей 10 мг/кг ch14.18-MMAE, наблюдалась стабилизация роста опухолей (**рисунке 9, Г**), а на 35-й день анализа, когда разница между группами ADC и контроля достигла максимума, средний объем опухолей в группе ADC был более чем в 10 раз меньше, нежели в группе контроля (95% ТРО).

Только при введении мышам повышенной дозы ch14.18-MMAE формировались «некротические» полости, занимающие значительную часть опухоли (**рисунке 9, В**). Последующее зарастание полостей и возобновление опухолевого роста указывает на сохранение жизнеспособных клеток на периферии опухоли, где эффективность проникновения препарата или экспрессия антигена могут быть недостаточными. Многократное введение высоких доз вероятно насытило периферические мишени, обеспечив глубокое проникновение препарата в

опухоль. Дополнительную роль в доставке ММАЕ в центральную область опухоли играет его возможность проявлять *bystander* эффект, а гипоксические условия центральной области могут усиливать эффект лекарства. Хотя макроскопически полости напоминают зоны некроза, механизм клеточной гибели в данном эксперименте не был охарактеризован. Первичным механизмом действия ауристатинов выступает индукция каспазо-зависимого апоптоза с арестом клеточного цикла в G₂/M-фазе, что было, в частности, показано *in vitro* для полученных в данной работе анти-GD2 минибоди-ММАЕ и scFv-ММАЕ.

Терапия конъюгатами ch14.18-ММАЕ и ch14.18-ММАF характеризовалась хорошей переносимостью животными без развития признаков системной токсичности в нескольких независимых экспериментах, и не вызывала значимой потери массы тела. Сильное и дозозависимое ингибирование роста опухолей под действием GD2-специфичных ADC в мышинной модели меланомы B78-D14, а также сравнимая эффективность ch14.18-ММАF в другой мышинной модели GD2-положительной лимфомы EL-4, продемонстрированная вне данной работы, позволяют рассматривать исследуемые ADC в качестве кандидатов для терапии GD2-экспрессирующих опухолей человека.

5. Противоопухолевая активность конъюгатов минибоди с лекарствами и сравнение биораспределения минибоди и антитела в мышинной модели рака

Фармакокинетические характеристики фрагментов антител в организме часто более непредсказуемы в сравнении с полноразмерными антителами. В следующем эксперименте проведено сравнение биораспределения в мышинной модели рака для анти-GD2 минибоди и антитела, на основе которых получены конъюгаты с лекарствами класса ауристатинов. По нашим данным, это первое фармакокинетическое исследование формата анти-GD2 минибоди *in vivo*.

Результаты анализа биораспределения молекул в виде процента введенной дозы препарата в пересчете на грамм типа ткани или плазмы крови (% ID/g) представлены на **рисунке 10, А и Б**. Динамика накопления в опухоли существенно различается для минибоди и антитела ch14.18. На ранних сроках после инъекции (2-4 ч) минибоди демонстрировало несколько более эффективное, однако статистически не отличающееся от антитела накопление в опухолевой ткани. Так, через 2 ч после введения накопление минибоди и ch14.18 в опухоли составляло 2.1% и 1.6% ID/g соответственно, а через 4 ч после введения – 2.8% и 2.0% ID/g соответственно. Однако уже через 8 ч после введения ситуация изменилась на противоположную – накопление антитела (2.3%) незначительно превысило накопление минибоди (1.5%) в опухоли. Данная тенденция усилилась со временем, и через 24 ч после введения содержание ch14.18 в опухоли (4.3%) уже значительно превосходило содержание минибоди (1.0%).

Большая разница в содержании молекул в плазме крови (**рисунок 10, Б**) наблюдалась уже через 2 ч после введения препаратов, когда детектировалось 23% ID/g минибоди (19% исходно введенного минибоди) и 57% ID/g антитела (47% исходно введенного антитела). Далее эти различия лишь усилились, и через 24 ч после введения в плазме крови детектировалось уже 0.9% ID/g минибоди и 22% ID/g антитела.

Наблюдаемую разницу в динамике содержания молекул в опухоли и в крови можно свести к следующим ключевым факторам: с одной стороны, минибоди, в первую очередь благодаря меньшему размеру, способно несколько более эффективно проникать в опухолевую ткань в первые часы после введения; с другой стороны, значительно более продолжительное время циркуляции полноразмерного антитела в крови обеспечивает его преимущественное накопление в опухоли со временем.

Более высокое суммарное накопление анти-GD2 антитела по сравнению с минибоди в опухоли на длительных интервалах времени необходимо рассматривать в широком контексте фармакологии антител, где суммарное накопление и распределение по опухоли представляют собой принципиально разные фармакокинетические параметры. Известно, что различные форматы фрагментов антител быстрее проникают из кровеносного русла в опухоль и более

гомогенно распространяются по ней в сравнении с полноразмерными антителами аналогичной специфичности в первые часы после введения.

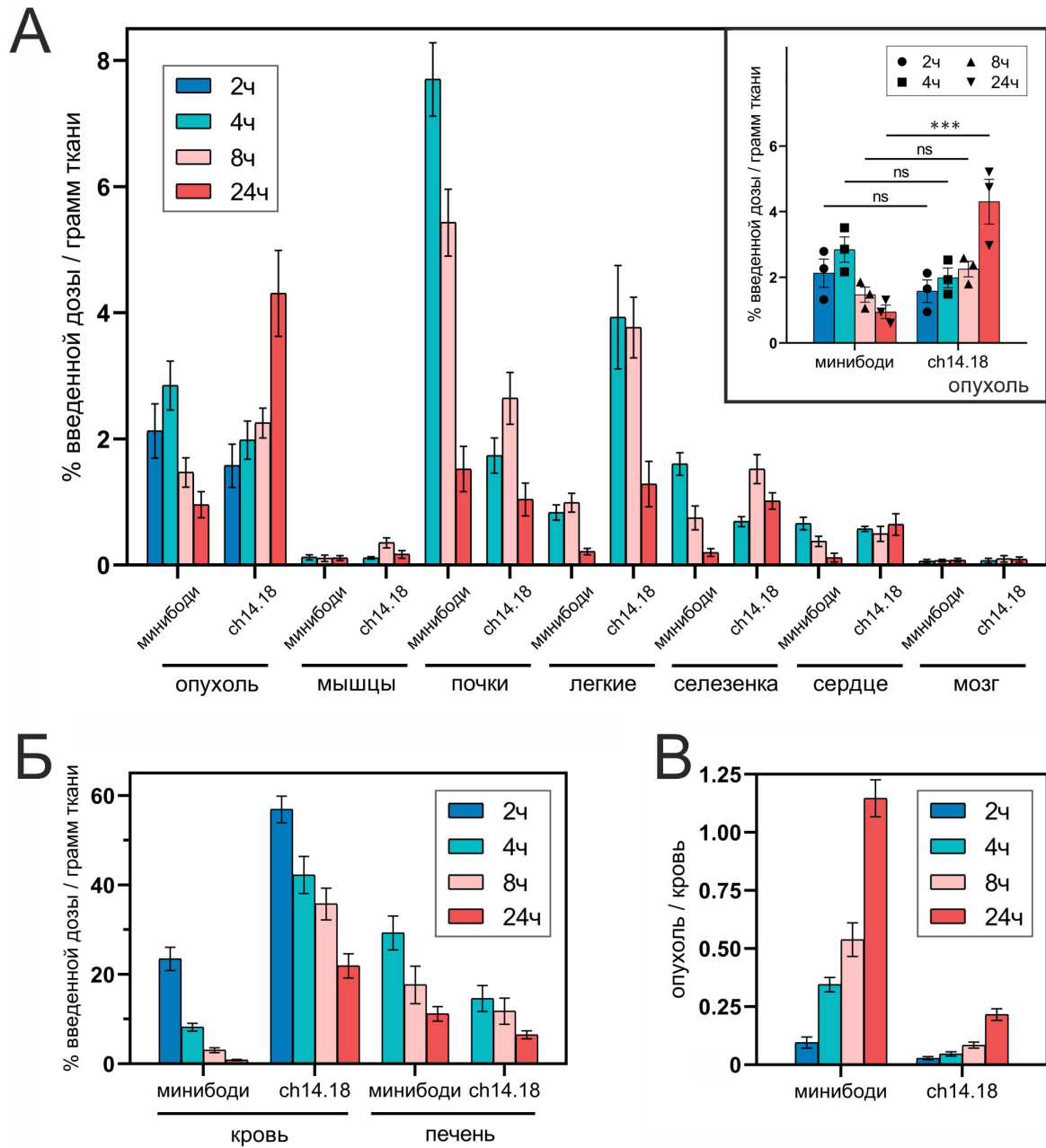


Рисунок 10. Биораспределение минибоди и антитела ch14.18 через 2, 4, 8 и 24 ч после внутривенного введения в мышинной модели GD2-положительной меланомы. А. Опухоль и органы мышей. Во вкладке дополнительно представлена точечная диаграмма накопления в опухоли; ns, нет значимого отличия между группами; *, $P < 0.001$; непарный t -тест. Б. Плазма крови и печень мышей. В. Соотношение «опухоль/кровь» (TBR) количества препарата, накопленного в опухолевой ткани, к количеству препарата, оставшемуся в крови. Данные представлены в виде процента введенной дозы в пересчете на грамм типа ткани или плазмы крови (% ID/g), а значения выражены как среднее \pm SEM для групп из 3 животных.**

Среди исследованных органов мышей, наиболее значимые различия наблюдались в профиле накопления минибоди и антитела в печени и почках, что указывает на путь и интенсивность выведения двух форматов молекул из организма. Биораспределение антитела ch14.18 в почечную ткань было невелико, достигая 2.6% ID/g через 8 ч после введения, в то время как биораспределение минибоди в почки было значительно более выраженным – 7.7% и 5.4%

ID/g через 4 ч и 8 ч после введения, соответственно. Разница в накоплении молекул в почках отчасти обусловлена их размерами: в то время как молекулярная масса полноразмерных антител значительно превышает порог клубочковой фильтрации, обычно принимаемый за 60-70 кДа, молекулярная масса минибоди близка к данному значению. Накопление обеих молекул в печени было наиболее высоким среди всех органов, при этом накопление минибоди значимо превышало накопление ch14.18 на всех временных точках анализа. Наибольшее содержание в печени детектировалось в первые часы после введения – 29% и 15% ID/g для минибоди и антитела, соответственно, через 4 ч после введения. Одна из ключевых причин более высокого накопления минибоди в сравнении с IgG как в печени, так и в почках заключается в его неспособности взаимодействовать с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который осуществляет рециркуляцию IgG из тканей обратно в кровоток.

Важным параметром оценки переносимости лекарственного препарата *in vivo* и возможности эскалации дозировки препарата в терапевтическом исследовании является соотношение «опухоль/кровь» (tumor-to-blood ratio, TBR) концентрации препарата, накопленного в опухолевой ткани, к концентрации препарата, оставшемуся в крови. В нашем анализе, TBR для минибоди существенно превышал этот показатель для антитела на всех проанализированных временных точках (**рисунок 10, В**). Так, через 24 ч после введения препаратов TBR минибоди достигал значений >1 , тогда как для антитела этот показатель составлял ~ 0.2 . Быстрое падение концентрации минибоди в крови и интенсивное выведение из организма приводят к его пониженному накоплению в нормальных тканях в сравнении с антителом на длительных интервалах времени – уже через 24 ч после инъекции накопление минибоди было значительно ниже в сравнении с антителом в тканях легких, селезенки и сердца.

Поскольку анти-GD2 минибоди демонстрировало благоприятный профиль биораспределения в мышинной модели рака, а его конъюгаты с лекарствами MMAE и MMAF показали наиболее высокие цитотоксические эффекты *in vitro* в сравнении с другими анти-GD2 FDC, конъюгаты минибоди-MMAE и минибоди-MMAF были выбраны для исследования противоопухолевой активности *in vivo*. Важно отметить, что первоначально планировалось также проанализировать биораспределение непосредственно для конъюгатов минибоди-MMAE и минибоди-MMAF, однако меченные выбранным флуоресцентным красителем FDC характеризовались низкой стабильностью.

* * *

Минибоди-MMAE и минибоди-MMAF вводили мышам в виде 5 инъекций в дозе 5 мг/кг массы с интервалом в 3 дня, что приводило к значительному ингибированию роста опухолей меланомы B78-D14 по сравнению с группой контроля (**рисунок 11, А**). Результаты были сопоставимы с эффектами соответствующих полноразмерных конъюгатов ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF, которые вводили мышам в той же дозе и по аналогичной схеме. К концу эксперимента, коэффициент относительного торможения роста опухолей (% TPO) в сравнении с группой контроля составил 51% для группы ch14.18-MMAE, 55% для группы минибоди-MMAE, 70% для группы ch14.18-MMAF и 74% для группы минибоди-MMAF.

Конъюгат минибоди-MMAF продемонстрировал несколько более выраженную активность по сравнению с минибоди-MMAE, и аналогичная ситуация наблюдалась для ADC, несущих MMAF и MMAE, однако статистически значимых различий в ингибировании роста опухолей под действием конъюгатов, несущих разные ауристатины, не наблюдалось. Все препараты характеризовались хорошей переносимостью животными в ходе эксперимента и не вызывали значимой потери массы тела (**рисунок 11, Б**). Важно отметить, что в эксперименте мышам вводилась не только одинаковая доза ADC и FDC (5 мг/кг массы тела), но и сопоставимое количество лекарства MMAE либо MMAF, что следует при учете различий молекулярных масс конъюгатов (примерно в 2 раза больше для ADC) и степени пришивки лекарства (DAR 2 для минибоди против DAR 4 для антитела).

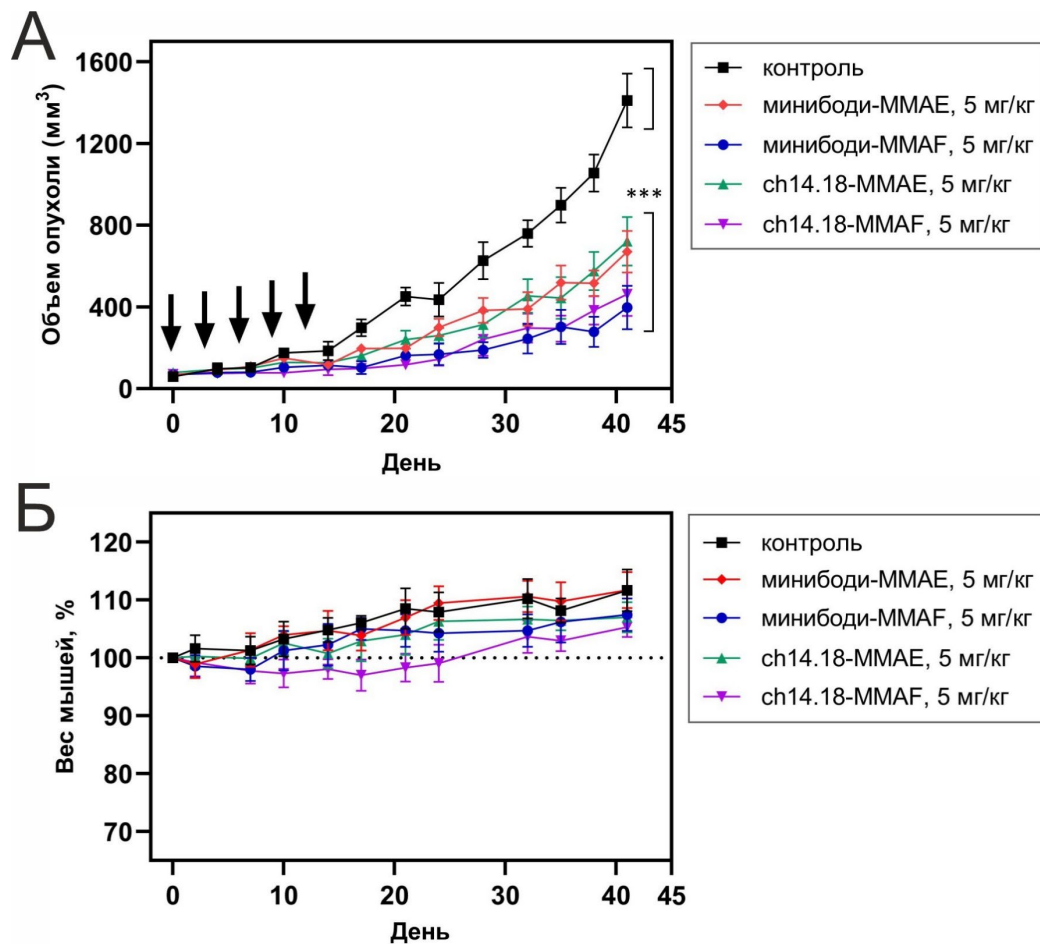


Рисунок 11. Противоопухолевая активность конъюгатов минибоди и антитела ch14.18 с лекарствами MMAE и MMAF в мышинной модели GD2-положительной меланомы B78-D14. А. Кривые динамики роста опухолей в самках мышей линии C57BL/6. *, $P < 0.001$ в сравнении с группой контроля, двухфакторный ANOVA с *post hoc* тестом Даннета. Дни введения препаратов обозначены стрелками. Б. Изменение веса мышей. Данные представлены в виде средних значений \pm SEM для групп из 4 животных.**

Сравнивая терапевтическая активность конъюгатов минибоди и полноразмерного антитела с лекарствами в мышинной модели рака представляется неожиданной, учитывая значительно более высокую цитотоксическую активность ADC *in vitro*. Данное несоответствие предполагает, что факторы, выходящие за рамки непосредственно цитотоксической активности – в первую очередь, более эффективные доставка и/или распределение по опухоли – могут играть решающую роль в определении терапевтических эффектов в используемой модели рака. Схожие закономерности, когда FDC демонстрируют сопоставимую или превосходящую активность *in vivo* несмотря на более низкую активность *in vitro*, описаны в литературе для ряда FDC при их сравнении с ADC аналогичной специфичности.

Хотя эскалация дозы для конъюгатов минибоди с лекарствами не проводилась в рамках данной работы, результаты фармакокинетического анализа форматов минибоди и антитела позволяют предположить, что терапевтическое окно для анти-GD2 FDC на основе минибоди – диапазон между минимально эффективной и максимально переносимой дозировками – может быть шире в сравнении с анти-GD2 ADC. Ускоренная элиминация минибоди из кровотока и сниженное накопление в здоровых тканях могут потенциально позволить увеличить частоту или величину дозирования для анти-GD2 FDC на основе минибоди без значимого увеличения системной токсичности. Данный аспект имеет особое значение для GD2-специфичной терапии, где клиническое применение высоких доз антител зачастую ограничено тяжелыми побочными эффектами, прежде всего нейропатической болью, вызванной связыванием с ганглиозидом GD2

на периферических нервах, а потенциальное использование ADC у педиатрических пациентов может быть сопряжено с риском низкой переносимости препарата.

6. Индукция иммуногенной клеточной гибели в мышинной модели рака под действием конъюгатов антител с лекарствами

Помимо прямых цитотоксических эффектов противоопухолевых препаратов, для некоторых из них показана опосредованная индукция противоопухолевого ответа со стороны иммунной системы хозяина. Один из важнейших механизмов, запускающих подобный ответ – иммуногенная клеточная гибель (ICD) опухолевых клеток – по определению представляет собой последовательность действий, выполняемых умирающей клеткой, которая в контексте иммунокомпетентного хозяина приводит к формированию адаптивного противоопухолевого иммунного ответа. Низкая иммуногенность GD2-положительной меланомы B78-D14 делает ее интересной моделью для изучения потенциала противоопухолевых препаратов индуцировать противоопухолевый иммунный ответ. Схожие иммунологические характеристики демонстрируют многие GD2-экспрессирующие опухоли человека, и прежде всего нейробластома высокого риска, которая характеризуется низкой мутационной нагрузкой и иммуносупрессивным опухолевым микроокружением. По этой причине, в работе поставлена задача провести анализ способности ADC ch14.18-MMAE DAR 4 и ch14.18-MMAF DAR 4 индуцировать иммуногенную клеточную гибель в мышинной модели меланомы B78-D14.

Классическим экспериментом для анализа ICD под действием потенциальных индукторов клеточной гибели является вакцинация мышей опухолевыми клетками, пред-инкубированными с индукторами, с последующим введением этим же мышам живых иммунологически наивных опухолевых клеток. Способность ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF индуцировать адаптивный противоопухолевый иммунитет была проанализирована посредством подкожной вакцинации мышей C57BL/6 умирающими клетками B78-D14, ранее обработанными данными ADC, с последующим введением мышам живых клеток в другой бок через 7 дней (схема эксперимента представлена на **рисунке 12, А**). Анализировалось время, которое требовалось для формирования опухолей в месте ввода живых клеток, а также динамика роста этих опухолей.

В группах мышей, которые были вакцинированы клетками пред-инкубированными с ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF, а также в группах положительных контролей (пред-инкубация с доксорубицином либо с конъюгатом ch14.18 и альдоксорубицина) наблюдалась задержка формирования опухолей по сравнению с негативным контролем. В качестве негативного контроля использовались некротические клетки меланомы B78-D14, которые обеспечивают вакцинацию мышей опухолеассоциированными антигенами в отсутствие активации механизмов иммуногенной клеточной гибели. К 12 дню после введения интактных клеток B78-D14 опухоли сформировались у всех мышей в группе негативного контроля, и в то же время во всех группах препаратов (группы 3-6 на **рисунке 12, Б**) мыши без опухолей присутствовали вплоть до 20-25 дня.

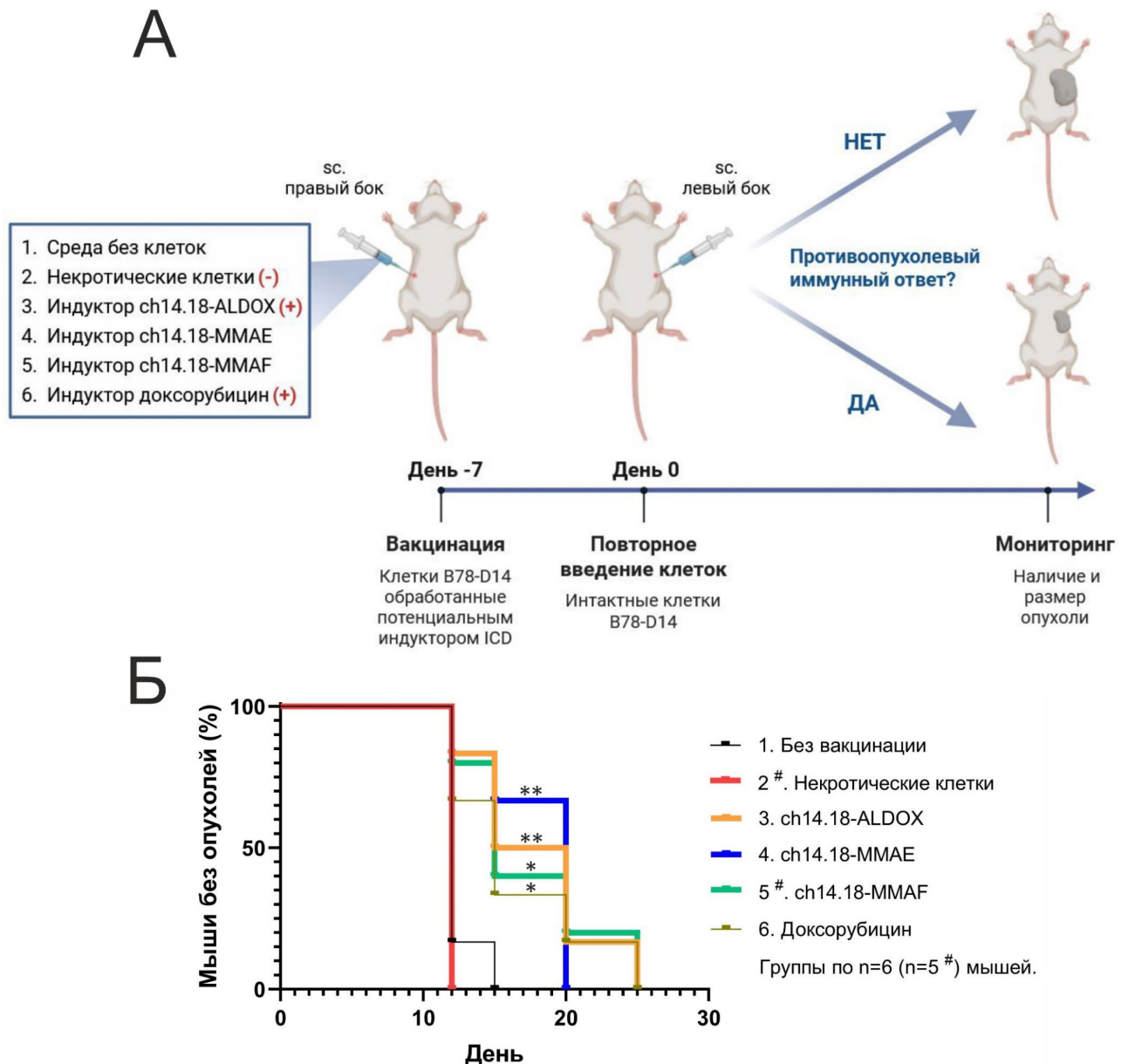


Рисунок 12. Индукция противоопухолевого иммунного ответа в ходе вакцинации клетками меланомы B78-D14, пред-инкубированными с анти-GD2 ADC. А. Схема эксперимента. Б. Доля мышей без опухолей. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ – в сравнении с группой 2 (некротические клетки), лог-ранк тест.

Несмотря на то, что опухоли в итоге сформировались у всех мышей в эксперименте, наблюдалось статистически достоверное ингибирование роста в группах, пред-обработанных тремя ADC (ch14.18-MMAE, ch14.18-MMAF, ch14.18-ALDOX), в сравнении с группой негативного контроля (**рисунок 13, А**). Кроме этого, в отличие от животных группы негативного контроля, все опухоли которых характеризовались агрессивным ростом, ответ в группах животных, получавших конъюгаты антител с MMAE или MMAF, а также в группах положительных контролей, характеризовался высокой вариабельностью: примерно равные доли животных демонстрировали отторжение опухолей (CR) либо формировали крупные опухоли (**рисунок 13, Б-Г**).

Важно подчеркнуть, что инкубация клеток с индукторами ICD перед вакцинацией мышей проводилась при существенно различающихся концентрациях индукторов. В то время как концентрация доксорубицина была выбрана в соответствии со стандартными протоколами, описанными в литературе, концентрации (и время инкубации с клетками) для анти-GD2 ADC подбирались в соответствии с их сравнительной цитотоксической активностью *in vitro*. Таким

образом, наблюдаемые эффекты в группах конъюгатов антител с ауристатидами MMAE и MMAF вызваны в десятки раз более низкими концентрациями препаратов, нежели в случае антрациклинов.

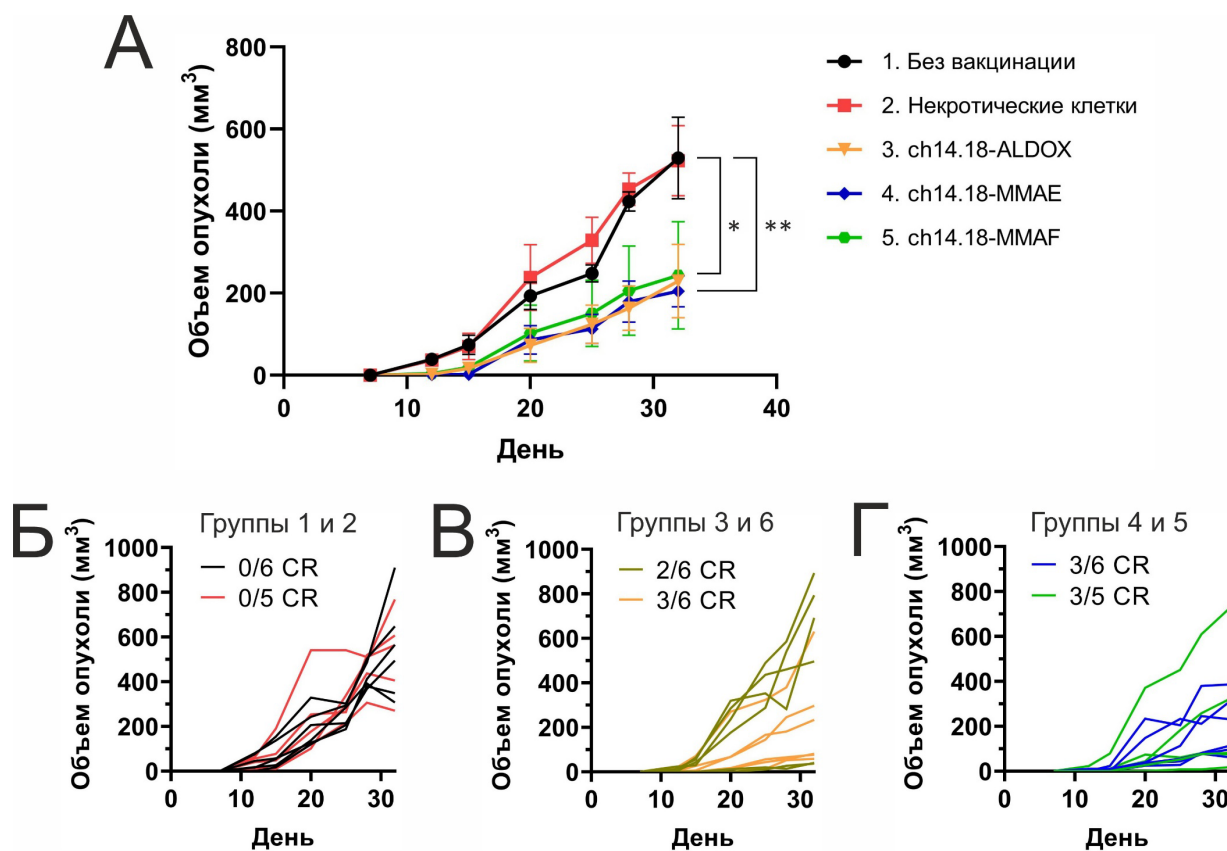


Рисунок 13. Индукция противоопухолевого иммунного ответа в ходе вакцинации клетками меланомы B78-D14, пред-инкубированными с анти-GD2 ADC (продолжение). А. Ингибирование роста опухолей в группах под действием ADC. *, $P < 0.05$ – между группой 2 (некротические клетки) и группой 5 (ch14.18-MMAF); **, $P < 0.01$ – между группой 2 и группой 4 (ch14.18-MMAE), непарный *t*-тест. **Б-Г.** Индивидуальные кривые роста опухолей мышей. CR, полный ответ.

В работе впервые показано, что GD2-специфичные ADC способны выступать в качестве индукторов иммуногенной клеточной гибели опухоли. Конъюгаты антител с лекарствами класса ауристатинов MMAE и MMAF не только напрямую уничтожают опухолевые клетки, но и стимулируют системный противоопухолевый иммунный ответ, превращая локальную клеточную гибель в *in situ* вакцину, которая может повысить чувствительность иммунологически «холодной» опухоли к последующей иммунотерапии.

ВЫВОДЫ

В работе получены конъюгаты GD2-специфичного антитела ch14.18 с лекарствами класса ауристатинов MMAE и MMAF со степенью пришивки лекарства к антителу DAR 4, характеризующиеся высоким связыванием с антигеном. Для ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF наблюдается прямая зависимость цитотоксического эффекта от уровня экспрессии GD2 в панели клеточных линий с различной экспрессией антигена. Значения IC₅₀ достигают 50 пМ для линий клеток с гиперэкспрессией GD2, а для GD2-отрицательных линий цитотоксическое действие ADC отсутствует даже при высоких концентрациях препаратов. Ch14.18-MMAF более эффективен в клетках с гиперэкспрессией GD2, в то время как ch14.18-MMAE проявляет более высокую токсичность в клетках, экспрессирующих GD2 на более низких уровнях.

ADC демонстрируют аналогичный родительскому антителу профиль биораспределения после системного введения в сингенной мышинной модели GD2-положительной меланомы, достигая значений 8% введенной дозы на грамм опухоли через 48 ч после введения. В ходе анализа противоопухолевых эффектов в этой же модели, при введении ADC в режиме 5 инъекций в дозировке 5 мг/кг массы тела, оба ADC эффективно ингибируют рост опухолей, при этом коэффициент относительного торможения роста опухолей составляет 66% для группы ch14.18-MMAE и 78% для группы ch14.18-MMAF. Увеличение дозы ch14.18-MMAE до 10 мг/кг дополнительно увеличивает эффективность терапии, приводя к стабилизации роста опухолей. Посредством вакцинации мышей опухолевыми клетками пред-обработанными ADC продемонстрирована способность ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF индуцировать противоопухолевый иммунитет в мышинной модели меланомы.

Результаты позволяют рассматривать данные ADC в качестве кандидатов для таргетной терапии GD2-экспрессирующих опухолей человека.

Впервые получены конъюгаты GD2-специфичных фрагментов антител с лекарствами (FDC), и изучена их функциональная активность в GD2-экспрессирующих опухолевых клеточных линиях и в мышинной модели рака. Анти-GD2 конъюгаты минибоди и scFv-фрагмента антитела с лекарствами MMAE и MMAF сохраняют антиген-связывающие свойства родительских молекул и демонстрируют селективную цитотоксическую активность в отношении GD2-экспрессирующих опухолевых линий. Цитотоксические эффекты конъюгатов на основе минибоди значительно превосходят эффекты конъюгатов на основе scFv.

В ходе анализа биораспределения в мышинной модели меланомы, минибоди демонстрирует несколько более высокое накопление в опухоли в сравнении с антителом ch14.18 на ранних сроках анализа, в то время как на поздних сроках анализа накопление минибоди в опухоли значительно уступает антителу. Одновременно, соотношение «опухоль/кровь» для минибоди значительно превышает этот показатель для ch14.18 на всех проанализированных временных точках, достигая значений >1 для минибоди против ~0.2 для ch14.18 через 24 ч после введения. Терапия мышей конъюгатами минибоди-MMAE и минибоди-MMAF приводит к значительному ингибированию роста опухолей, эквивалентному эффектам соответствующих полноразмерных ADC ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF, которые вводили мышам в той же дозировке препарата.

Использование анти-GD2 минибоди выступает перспективной альтернативой полноразмерному антителу в конъюгатах с лекарствами, демонстрируя благоприятный профиль биораспределения и высокую противоопухолевую активность в мышинной модели рака.

Посредством оригинального подхода получены пегилированные конъюгаты GD2-специфичных scFv-фрагментов антител с лекарствами майтанзиноидами DM1 и DM4. Пегилированные FDC сохраняют антиген-связывающие свойства исходных молекул и проявляют селективное цитотоксическое действие в GD2-положительных клетках. Конъюгат с лекарством DM4 проявляет более сильные эффекты в сравнении с конъюгатом с DM1 в линии клеток с гиперэкспрессией GD2. Пегилированные FDC могут обладать преимуществами в терапии по сравнению с другими форматами, обусловленными потенциально более эффективным накоплением молекул в опухоли за счет их малого размера и одновременно длительного времени циркуляции в крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Kalinovsky DV**, Titov MM, Kholodenko IV, Kibardin AV, Svirshchevskaya EV, Deyev SM, Kholodenko RV. GD2-Targeted Minibody-Drug Conjugates Match the Potency of IgG-Based ADCs in a Mouse Cancer Model. *Int J Mol Sci.* 2026 Feb 19;27(4):1974. <https://doi.org/10.3390/ijms27041974>
2. **Kalinovsky DV**, Kholodenko IV, Svirshchevskaya EV, Kibardin AV, Ryazantsev DY, Rozov FN, Larin SS, Deyev SM, Kholodenko RV. Targeting GD2-Positive Tumor Cells by Pegylated scFv Fragment-Drug Conjugates Carrying Maytansinoids DM1 and DM4. *Curr Issues Mol Biol.* 2023 Oct 5;45(10):8112-8125. <https://doi.org/10.3390/cimb45100512>
3. **Kalinovsky DV**, Kholodenko IV, Kibardin AV, Doronin II, Svirshchevskaya EV, Ryazantsev DY, Konovalova MV, Rozov FN, Larin SS, Deyev SM, Kholodenko RV. Minibody-Based and scFv-Based Antibody Fragment-Drug Conjugates Selectively Eliminate GD2-Positive Tumor Cells. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 8;24(2):1239. <https://doi.org/10.3390/ijms24021239>
4. **Kalinovsky DV**, Kibardin AV, Kholodenko IV, Svirshchevskaya EV, Doronin II, Konovalova MV, Grechikhina MV, Rozov FN, Larin SS, Deyev SM, Kholodenko RV. Therapeutic efficacy of antibody-drug conjugates targeting GD2-positive tumors. *J Immunother Cancer.* 2022 Jun;10(6):e004646. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004646>
5. Kholodenko IV, **Kalinovsky DV**, Svirshchevskaya EV, Doronin II, Konovalova MV, Kibardin AV, Shamanskaya TV, Larin SS, Deyev SM, Kholodenko RV. Multimerization through Pegylation Improves Pharmacokinetic Properties of scFv Fragments of GD2-Specific Antibodies. *Molecules.* 2019; 24(21):3835. <https://doi.org/10.3390/molecules24213835>
6. Kholodenko RV, **Kalinovsky DV**, Doronin II, Ponomarev ED, Kholodenko IV. Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Success and Limitations. *Curr Med Chem.* 2019;26(3):396-426. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170817152554>
7. Kholodenko IV, **Kalinovsky DV**, Doronin II, Deyev SM, Kholodenko RV. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *J Immunol Res.* 2018 Jul 11;2018:7394268. <https://doi.org/10.1155/2018/7394268>

Тезисы докладов на конференциях

1. **Калиновский Д.В.**, Титов М.М., Свирщевская Е.В., Кибардин А.В., Ларин С.С., Деев С.М., Холоденко Р.В. Противоопухолевая эффективность конъюгатов анти-GD2 минибоди и полноразмерных антител с лекарствами в мышинной модели рака. Сборник тезисов VII всероссийской конференция «Фундаментальная гликобиология», Москва, 2025, стр. 19.
2. **Калиновский Д.В.**, Доронин И.И., Холоденко И.В., Деев С.М., Холоденко Р.В. Создание и анализ цитотоксических эффектов пегилированных конъюгатов scFv-фрагментов GD2-специфичных антител с препаратами группы майтанзинов. XXXV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2023, стр. 161.
3. **Калиновский Д.В.**, Холоденко И.В., Гречихина М.В., Доронин И.И., Деев С.М., Холоденко Р.В. Получение конъюгатов GD2-специфичных антител с лекарствами MMAE и MMAF и оценка их цитотоксического действия на панели клеточных линий с различной экспрессией ганглиозида GD2. Тезисы XXXIV международной зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2022, стр. 133.
4. **Kalinovsky DV**, Kibardin AV, Kholodenko IV, Doronin II, Svirshchevskaya EV, Larin SS, Deyev SM, Kholodenko RV. Antibody fragment-drug conjugates as a novel strategy for targeted therapy of ganglioside GD2-positive tumors. *FEBS Open Bio*, 2022, 12 (S1), 67–336.