

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный Научный Центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН)

На правах рукописи

Калиновский Даниэль Владиславович

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Холоденко Роман Васильевич

Москва - 2026

Оглавление

Введение	4
1. Обзор литературы	8
1.1. Ганглиозид GD2 как опухолеассоциированный маркер	8
1.1.1. Биосинтез.....	8
1.1.2. Функциональная роль при злокачественной трансформации.....	13
1.2. Противоопухолевые антитела: форматы, механизмы действия и выбор мишеней для терапии	17
1.3. Конъюгаты антител с лекарствами в терапии рака	27
1.3.1. Антитела и их мишени.....	28
1.3.2. Линкеры.....	29
1.3.3. Методы конъюгации лекарств.....	32
1.3.4. Лекарства.....	35
1.3.5. Иммуностимулирующие эффекты ADC.....	39
1.3.6. Новые форматы ADC и комбинаторные стратегии терапии.....	41
1.4. Фрагменты антител как альтернатива полноразмерным антителам в терапии рака: фокус на конъюгаты с лекарствами	47
1.4.1. Основные форматы.....	47
1.4.2. Преимущества и недостатки в терапии рака.....	49
1.4.3. Фрагменты антител в клинической практике.....	52
1.4.4. Конъюгаты фрагментов антител с лекарствами.....	55
1.5. Стратегии GD2-специфичной иммунотерапии рака	57
1.5.1. Канонические полноразмерные антитела.....	57
1.5.2. Другие стратегии терапии.....	61
2. Материалы и методы	70
2.1. Материалы.....	70
2.2. Методы работы с белками.....	71
2.3. Методы работы с культурами клеток.....	77
2.4. Методы работы с животными.....	79
2.5. Обработка результатов и статистический анализ.....	82
3. Результаты и их обсуждение	83
3.1. Получение конъюгатов полноразмерного антитела ch14.18 с лекарствами MMAE и MMAF	83
3.1.1. Реакции конъюгации и физико-химические свойства ADC.....	83
3.1.2. Антиген-связывающие свойства ADC.....	88

3.2. Получение конъюгатов минибоди и scFv с лекарствами MMAE и MMAF.....	90
3.2.1. Реакции конъюгации и физико-химические свойства FDC.....	90
3.2.2. Антиген-связывающие свойства FDC.....	94
3.3. Получение пегилированных конъюгатов scFv с лекарствами DM1 и DM4.....	96
3.3.1. Реакции конъюгации и физико-химические свойства пегилированных FDC.....	96
3.3.2. Антиген-связывающие свойства пегилированных FDC.....	101
3.4. Подбор клеточных моделей для анализа GD2-специфичных молекул.....	102
3.5. Цитотоксическая активность GD2-специфичных конъюгатов в опухолевых клеточных линиях.....	104
3.5.1. Конъюгаты антитела ch14.18 с лекарствами MMAE и MMAF.....	104
3.5.2. Конъюгаты минибоди и scFv-фрагмента с лекарствами MMAE и MMAF.....	108
3.5.3. Пегилированные конъюгаты scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4.....	110
3.6. Биораспределение GD2-специфичных молекул в мышинной модели рака.....	113
3.6.1. Анализ ADC и полноразмерного антитела.....	113
3.6.2. Анализ минибоди и полноразмерного антитела.....	116
3.7. Противоопухолевая активность <i>in vivo</i> конъюгатов полноразмерного антитела с лекарствами.....	121
3.8. Противоопухолевая активность <i>in vivo</i> конъюгатов минибоди с лекарствами.....	124
3.9. Индукция противоопухолевого иммунитета в мышинной модели рака под действием конъюгатов антител с лекарствами.....	128
Выводы.....	132
Список сокращений.....	134
Благодарности.....	136
Список литературы.....	137
Приложения.....	174
Приложение 1. Аминокислотная структура антитела ch14.18.....	174
Приложение 2. Расчет степени пришивки DAR для ch14.18-MMAE в хроматографии гидрофобных взаимодействий.....	175
Приложение 3. Антиген-связывающие свойства флуоресцентно-меченных препаратов для экспериментов в мышинной модели рака.....	176
Приложение 4. Биораспределение препаратов в мышинной модели рака.....	177

Введение.

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 paclitaxel – 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 [1]. С 2022 года dinutuximab beta одобрен для применения в России [2]. 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 [3, 4].

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 [5, 6]. Более половины клинически одобренных ADC, а также большинство кандидатов активных клинических исследований предназначены для лечения именно солидных опухолей. Подобный фокус на разработке ADC к солидным опухолям 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 еще 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 [7, 8]. Конъюгация с фрагментом антитела может обеспечить цитотоксическому препарату потенциально более высокое накопление в опухоли. Одновременно, фрагменты антител в норме 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.

Задачи исследования.

1. В нашей лаборатории были впервые получены конъюгаты антитела *dinutuximab* (также известного как *ch14.18*) с лекарствами класса ауристатинов MMAE и MMAF, которые были сайт-направленно конъюгированы к межцепочечным цистеинам антитела, и была показана их специфическая активность в GD2-экспрессирующих опухолевых клеточных линиях и в мышинной модели GD2-положительной лимфомы [9]. Первое направление работы данного исследования, продолжающее изучение этого же формата анти-GD2 ADC, связано с получением конъюгатов *ch14.18*-MMAE и *ch14.18*-MMAF с оптимизированной степенью пришивки лекарства к антителу, сравнимой с конъюгатами антител и ауристатинов, одобренных для клинического применения, и благоприятными антиген-связывающими свойствами для дальнейшего анализа их функциональных свойств *in vitro* и *in vivo*. Цитотоксическое действие полученных ADC проанализировано в панели клеточных линий с различной экспрессией ганглиозида GD2. В экспериментах *in vivo* проведен анализ биораспределения и накопления ADC в опухоли в сравнении с родительским антителом, а также изучена противоопухолевая эффективность ADC в мышинной модели GD2-положительной меланомы.

2. Различные форматы GD2-специфичных фрагментов антител рассматриваются в качестве терапии рака [10]. В то же время, в литературе отсутствуют работы по изучению GD2-специфичных конъюгатов фрагментов антител с лекарствами. Второе направление работы данного исследования связано с получением и анализом конъюгатов минибоди и scFv-фрагмента антитела, оба из которых созданы на основе полноразмерного антитела *dinutuximab*, с лекарствами MMAE и MMAF. Цитотоксическое действие FDC изучено в клеточных линиях с различной экспрессией ганглиозида GD2. В мышинной модели GD2-положительной меланомы проведено сравнение биораспределения и накопления в опухоли для минибоди и антитела *dinutuximab*, а также проанализированы сравнительные противоопухолевые эффекты их конъюгатов с лекарствами.

3. Конъюгация белков с полиэтиленгликолем является широко используемым подходом для увеличения их времени циркуляции в организме. Полиэтиленгликоль также находит все большее распространение в задачах по улучшению гидрофильности линкеров в составе ADC. В ранее опубликованной в нашей лаборатории работе [11], мультимеризация GD2-специфичных scFv-фрагментов антитела dinutuximab с использованием молекул полиэтиленгликоля была рассмотрена в качестве платформы для создания иммуноконъюгатов с благоприятными фармакокинетическими свойствами *in vivo*. В данной работе поставлена задача получить конъюгаты анти-GD2 scFv-фрагментов и лекарств класса майтанзиноидов DM1 и DM4 с использованием поливалентных молекул полиэтиленгликоля. Изучены физико-химические и антиген-связывающие свойства пегилированных FDC, а также их цитотоксическое действие в опухолевых линиях с различной экспрессией GD2.

4. Помимо прямых цитотоксических эффектов противоопухолевых препаратов, для некоторых из них показана индукция противоопухолевого ответа со стороны иммунной системы хозяина. Отдельной задачей данной работы было проанализировать способность полученных ADC индуцировать адаптивный противоопухолевый иммунитет в ходе вакцинации в сингенной мышинной модели рака.

Новизна и научно-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.

Трансляционная значимость работы подтверждается 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 (M3554; исследование NCT06641908).

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).

По тематике диссертации опубликовано 5 экспериментальных и 2 обзорные статьи в рецензируемых журналах:

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>

1. Обзор литературы.

1.1. Ганглиозид GD2 как опухолеассоциированный маркер.

1.1.1. Биосинтез.

Ганглиозиды представляют собой гликофинголипиды которые содержат в своей гидрофильной олигосахаридной цепи один или несколько остатков сиаловых кислот – N-ацетиловых производных нейраминовой кислоты. Отец «химии мозга» Иоганн Л. В. Тудикум впервые охарактеризовал гликофинголипиды в 1884 году [12], назвав гидрофобную основу этих молекул «сфингозином» в честь мифологического сфинкса по причине её загадочных на тот момент свойств. Термин «ганглиозид» был впервые использован Эрнстом Кленком уже в 1942 году [13] для обозначения липидов, выделенных из ганглиев (нервных узлов) головного мозга.

Церамид, выступающий в роли гидрофобной части ганглиозида, состоит из длинной цепи сфингозина и жирной кислоты. С помощью церамида ганглиозиды закрепляются в наружном слое плазматической мембраны клеток. Гидрофильная углеводная часть ганглиозидов состоит из остатков глюкозы, галактозы, N-ацетилгалактозамина и сиаловой кислоты, которые могут претерпевать многочисленные структурные модификации, такие как O-ацетилирование, N-ацетилирование или сульфатирование. Гидрофильная часть молекулы экспонируется во внеклеточное пространство, и такая ориентация ганглиозидов в плазматической мембране определяет их основные биологические функции.

Вне зависимости от удлинения основной «коровой» цепи, ганглиозиды классифицируют в соответствии с классификацией Свеннергольма [14] – в зависимости от количества остатков сиаловой кислоты (от 0 до 3), связанных с лактозилцерамидом. Моносиалоганглиозиды серии a, такие как GM1, GM2 и GM3, называют простыми ганглиозидами, тогда как GD3, GD2 и GD1b (ганглиозиды b-серии) представляют собой более сложные ганглиозиды и имеют два остатка сиаловой кислоты в составе углеводных фрагментов (**рисунок 1.1**).

Ганглиозиды в основном расположены в богатых гликолипидами доменах, называемых липидными рафтами, на внешнем слое плазматической мембраны клетки. Липидные рафты состоят из фосфолипидов, холестерина, и гликофинголипидов, а также обогащены специфическими белками. Рафты вовлечены в основные сигнальные пути клетки в физиологических условиях, а ганглиозиды рафтов участвуют в клеточном распознавании [15], адгезии и модулировании сигнальных путей клеток [16], а также способствуют формированию самих рафтовых доменов [17].

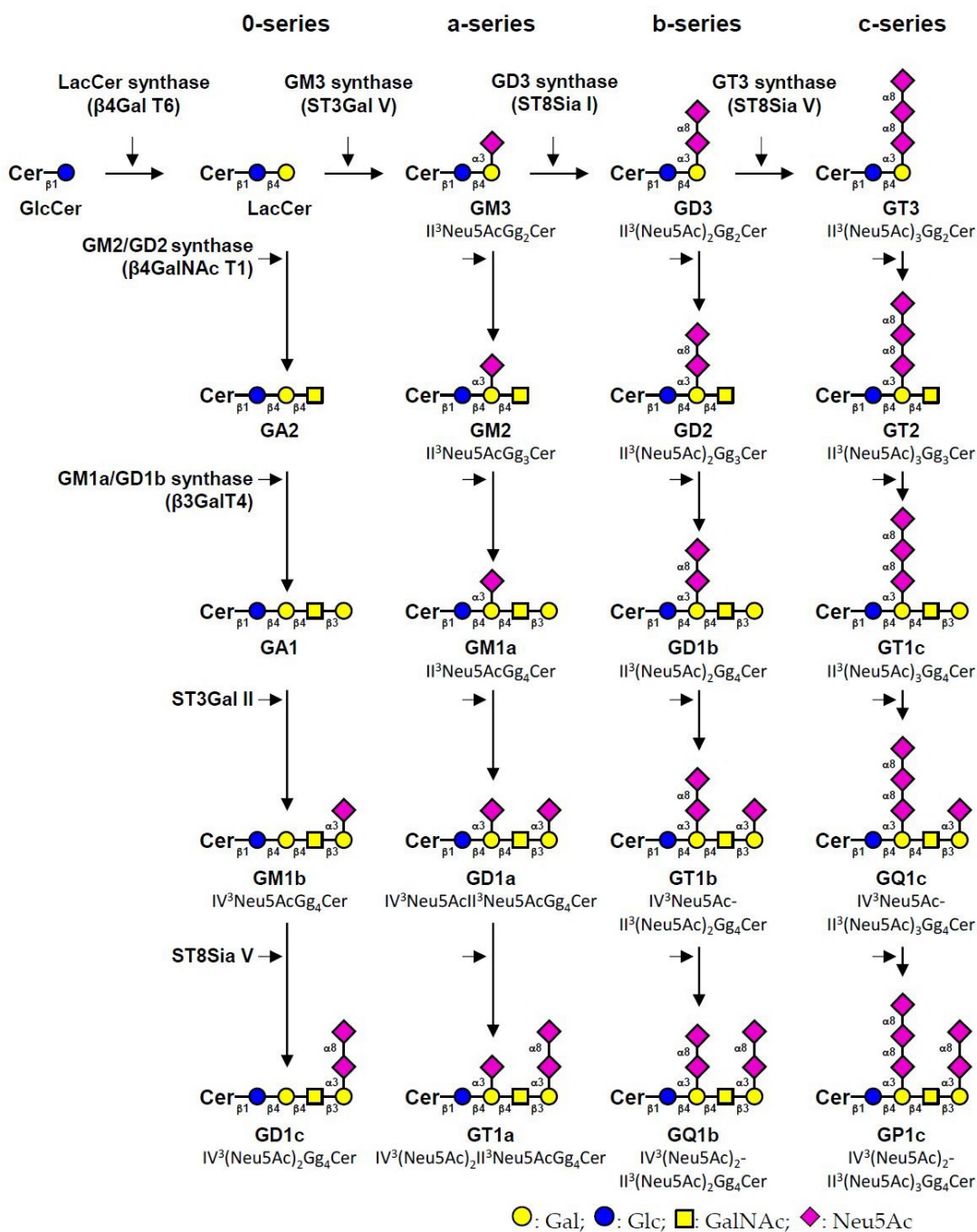


Рисунок 1.1. Упрощенная схема биосинтеза ганглиозидов [18]. Ганглиозиды подразделяются на 4 серии по количеству остатков сиаловой кислоты, связанных с лактозилцерамидом (LacCer).

Содержание ганглиозидов наиболее велико в нервных клетках, и конкретно в конусах роста аксонов и в синапсах между нервными клетками. Разнообразие ганглиозидов очень высоко по причине большого числа вариантов углеводных и церамидных компонентов, входящих в их состав; так, в клетках млекопитающих найдено не менее 188 типов ганглиозидов [19]. Углеводная часть ганглиозидов синтезируется в аппарате Гольджи клетки посредством последовательного действия различных гликозилтрансфераз. Паттерны экспрессии ганглиозидов как в ходе нормального развития организма, так и в ходе прогрессии заболеваний в значительной степени связаны с изменениями в экспрессии гликозилтрансфераз, участвующих в синтезе

ганглиозидов, а эти изменения, в свою очередь, регулируются на уровне транскрипции и пост-трансляционной модификации. Регуляция на уровне транскрипции включает факторы транскрипции (TF) и эпигенетические модификации, и объясняет большинство изменений состава гликолипидов, наблюдаемых в ходе нормального развития и опухолевой трансформации [20, 21]. Гликозилтрансферазы являются важными инструментами для определения функций конкретных ганглиозидов. Широкий ряд стратегий, таких как введение экзогенных ганглиозидов, а также оверэкспрессия или даунрегуляция определенных гликозилтрансфераз, используется для расшифровки роли ганглиозидов в физиологии и патологиях. Мыши, которым проводили полное удаление ганглиозидов посредством двойного нокаута по генам GM2/GD2- и GM3-синтаз (гены *B4GALNT1* и *ST3GAL5*, соответственно), характеризовались дегенерацией ЦНС в виде повреждения аксонов, появления вакуолизированных олигодендроцитов и аномального взаимодействия аксонов и глии [22].

Ганглиозиды привлекли внимание исследователей в качестве опухолеассоциированных маркеров, поскольку в ходе сравнения их экспрессии на опухолевых клетках с экспрессией соответствующими нормальными тканями было показано, что, во-первых, уровень экспрессии некоторых ганглиозидов на мембранах опухолевых клеток увеличивается, а, во-вторых, появляются новые ганглиозиды, которые отсутствуют либо редко экспрессируются на нормальных клетках организма. К таким опухолеассоциированным ганглиозидам в первую очередь относят ганглиозиды b-серии GD2 и GD3, а также их O-ацетилированные формы [17]. Данные дисиалоганглиозиды сильно экспрессированы в ходе онтогенеза, однако их экспрессия низка либо отсутствует в здоровых тканях взрослого организма человека, не являющихся нервными [23]. GD3 и GD2 преимущественно экспрессированы в клетках ЦНС, периферических нервных тканях, меланоцитах кожи и лимфоцитах. Процесс туморогенеза приводит к оверэкспрессии GD3 и GD2 в первую очередь в нейроэктодермальных опухолях и саркомах, где они рассматриваются в качестве онкофетальных маркеров [18].

Ганглиозид GD2 (структура представлена на **рисунке 1.2**) синтезируется из его предшественника GD3 посредством GM2/GD2-синтазы, кодируемой геном *B4GALNT1*. GD3-синтаза (ген *ST8SIA1*) является ключевым ферментом, модулирующим переключение с простых (0- и a-серии) на более сложные высокосиалирированные ганглиозиды b-серии. То, какой из двух ганглиозидов – GD2 либо GD3 – будет преобладать на клетках конкретной опухоли, зависит от преобладания экспрессии одной из двух гликозилтрансфераз, GM2/GD2-синтазы либо GD3-синтазы соответственно, участвующих в синтезе данных ганглиозидов. Высокое соотношение GD2/GD3, характерное для нейробластомы, является результатом как низкой экспрессии GD3-синтазы, так и высокой экспрессии GM2/GD2-синтазы, в то время как для меланомы данное соотношение низко (<1), поскольку для этой опухоли характерна высокая экспрессия именно

GD3-синтазы [24, 25]. В то же время, GD2 не обязательно является конечным продуктом реакции, а может выступать в качестве промежуточного субстрата для синтеза ганглиозидов более высокой молекулярной массы. Активность и уровни экспрессии различных ферментов биосинтеза могут как положительно, так и отрицательно влиять на содержание GD2, приводя к формированию GD2-положительного либо GD2-отрицательного фенотипа.

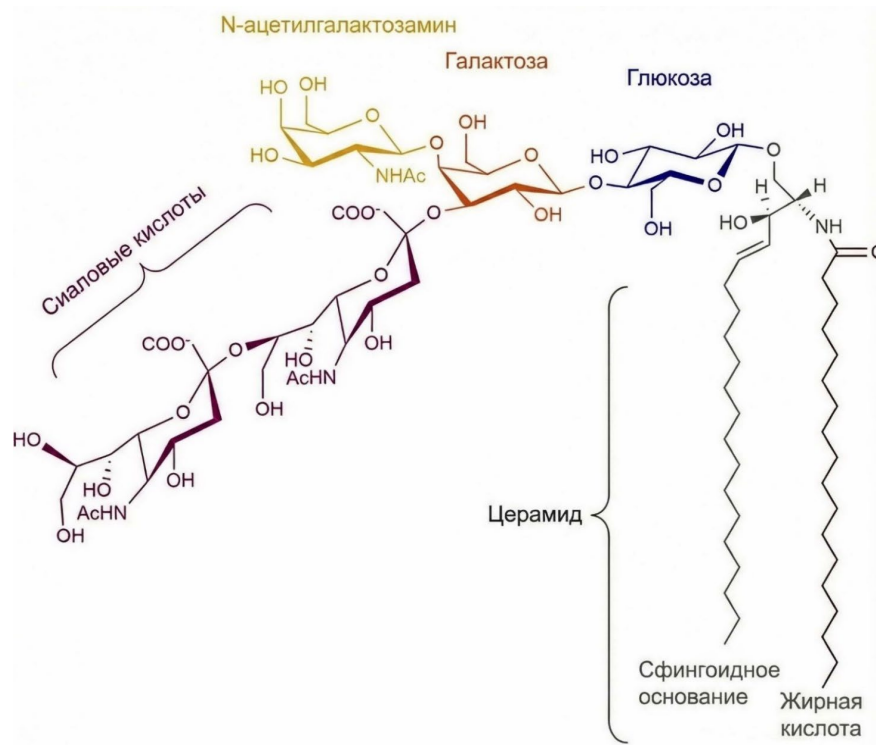


Рисунок 1.2. Структура ганглиозида GD2 [26].

Уровень экспрессии мРНК GD3- и/или GM2/GD2-синтазы повышен во многих опухолях по сравнению со здоровыми контролями соответствующих тканей организма, что может рассматриваться в качестве маркеров злокачественности, гистопатологической классификации, а также быть использовано для прогнозирования течения болезни [27, 28, 29]. Так, например, в работе нашей лаборатории [30] было показано, что экспрессия каждого из двух генов *ST8SIA1* и *B4GALNT1* по отдельности позволяет разграничивать GD2-позитивные и GD2-негативные образцы в различных опухолях и здоровых тканях пациентов, а двухгенная сигнатура, объединяющая экспрессию этих двух генов, служит существенно более эффективным предиктором GD2-позитивного фенотипа, чем экспрессия каждого из двух генов. Валидация данной двухгенной сигнатуры на независимых наборах RNA-seq данных подтвердила её способность надёжно разграничивать предположительно GD2-положительные и GD2-отрицательные опухоли и ткани. Анализ образцов из базы данных педиатрических опухолей TARGET выявил максимальные значения двухгенной сигнатуры для GD2-положительной нейробластомы среди всех проанализированных образцов, а применение данного подхода к

образцам из базы данных TCGA подтвердило характерную [31] экспрессию GD2 при трижды негативном раке молочной железы (ТНPMЖ; ER-/PR-/HER2- фенотип).

Ганглиозид GD2 обладает рядом преимуществ перед другими ганглиозидами в качестве мишени для противоопухолевой терапии, поскольку, будучи гиперэкспрессированным на опухолевых клетках, он отсутствует либо экспрессируется в незначительном количестве на здоровых клетках организма. В частности, даже на мембранах нейронов ЦНС, периферических нейронов и меланоцитов кожи, где его экспрессия максимальна, GD2 является минорным ганглиозидом, составляя 1-2% от общего числа ганглиозидов, и уровень его экспрессии в 3-8 раз ниже по сравнению с другими опухолеассоциированными ганглиозидами, и конкретно, ганглиозидом GD3 [32].

Ганглиозид GD2 оверэкспрессирован в клеточных линиях и биоптатах пациентов с нейробластомой, меланомой [33], различными саркомами [34], ретинобластомой [35], глиомами [36], мелкоклеточным раком легкого (МРЛ) [37], раком мочевого пузыря [38], колоректальным раком [39], и различными типами рака молочной железы [40, 31]. Экспрессия GD2 сильно варьирует в опухолях различных типов рака: по разным данным, он детектируется в 25% рабдомиосарком [41], в 59% случаев рака молочной железы [31], в 75% первичных и метастазирующих меланом и в 96% нейробластом пациентов [42]. Среди опухолей, наиболее высокий уровень экспрессии GD2 наблюдается на клетках первичных нейробластом и достигает 10^7 молекул на клетку [43, 28].

Отдельно стоит выделить 9-О-ацетилированную форму ганглиозида GD2 (OAcGD2), которая имеет еще более ограниченный профиль экспрессии в сравнении с GD2 в здоровых тканях организма, включая практически полное отсутствие маркера на периферических нейронах человека [44]. OAcGD2 в норме ко-экспрессируется с GD2 на опухолевых клетках, при этом соотношение OAcGD2/GD2 по некоторым данным составляет от 10 до 50% [45]. Используя OAcGD2-специфичное антитело 8B6, которое не связывает GD2, Alvarez-Rueda et al. [46] выявили экспрессию этого маркера в 100% образцов нейробластомы, 75% МРЛ, 50% меланомы и 33% карциномы почек.

Будучи гиперэкспрессированным у большинства пациентов с нейробластомой, GD2 служит хорошим диагностическим маркером данной опухоли, что является одной из причин успеха терапии нейробластомы GD2-специфичными антителами в клинике [47], а также позволяет дифференцировать её от доброкачественной ганглионевромы и ганглионейробластомы среднего уровня злокачественности, которые либо не экспрессируют данный ганглиозид, либо экспрессируют его на низком уровне. Высокие уровни шеддинга (сбрасывания) GD2 с клеток в циркуляцию коррелируют с более быстрым прогрессированием нейробластомы [48]. Так, было показано, что у больных с нейробластомой шеддинг GD2 прямо коррелирует со степенью и

скоростью развития опухоли; пациенты с высоким уровнем циркулирующего GD2 (>568 пмоль/мл) имеют более короткую среднюю выживаемость без прогрессирования (около 9 месяцев) по сравнению с пациентами с низким уровнем GD2 (<103 пмоль/мл, 28 месяцев) [49].

Использование ганглиозида GD2 в качестве прогностического маркера нейробластомы целесообразно не во всех случаях, так как до сих пор не обнаружено однозначной корреляции между экспрессией GD2 и такими важными клинико-биологическими параметрами нейробластомы высокого риска (~50% случаев, пятилетняя общая выживаемость пациентов 60% [50]), как возраст постановки диагноза, клиническая стадия, и амплификация гена *MYCN* – одного из ключевых прогностических маркеров агрессивности нейробластомы [51, 52]. В то же время, уровень экспрессии GD2 на клетках нейробластомы служит отличным прогностическим фактором для предсказания результатов иммунотерапии с использованием GD2-специфичных антител. Terzic et al. [42] показали, что низкий уровень экспрессии GD2 в первичных опухолях пациентов с нейробластомой высокого риска до терапии анти-GD2 антителами коррелировал с повышенным риском последующего рецидива заболевания. Эти результаты указывают на то, что устойчивость к анти-GD2 иммунотерапии может быть связана с наличием GD2-негативных клеток в первичных опухолях.

1.1.2. Функциональная роль при злокачественной трансформации.

В ходе встраивания во внешний слой плазматической мембраны, ганглиозиды преимущественно локализуются в липидных рафтах, которые функционируют как высокоупорядоченные динамические сигнальные платформы. Концентрируя рецепторы, киназы и адапторные белки в ограниченном пространственном объёме, липидные рафты существенно снижают термодинамические барьеры для молекулярных взаимодействий, тем самым обеспечивая усиленную трансдукцию сигналов [53]. Ввиду отсутствия цитозольного домена ганглиозида лишены способности к прямой передаче сигнала внутрь клетки, поэтому их эффекторные функции реализуются опосредованно – путем физического и функционального сопряжения (*цис*-взаимодействия) с трансмембранными белками в рафтах.

Как и в случае ряда других ганглиозидов, для GD2 показано, что он может модулировать нисходящие или восходящие клеточные сигнальные процессы посредством *цис*-взаимодействий с различными молекулами в рафтах (в частности, с интегринами и рецепторными тирозинкиназами) и *транс*-взаимодействий с микроокружением клетки [54, 55]. Эти взаимодействия, которые являются частью биологии нормальных клеток, могут быть изменены в опухолевых клетках, в которых изменения состава ганглиозидов активируют или ингибируют пролиферативные сигнальные пути. При этом, ганглиозид GD2, как и его предшественник GD3,

в основном играет *про*-опухолевую роль в контексте злокачественной трансформации, в первую очередь в нейроэктодермальных опухолях (см. **рисунок 1.3**) [18, 26, 56, 57].

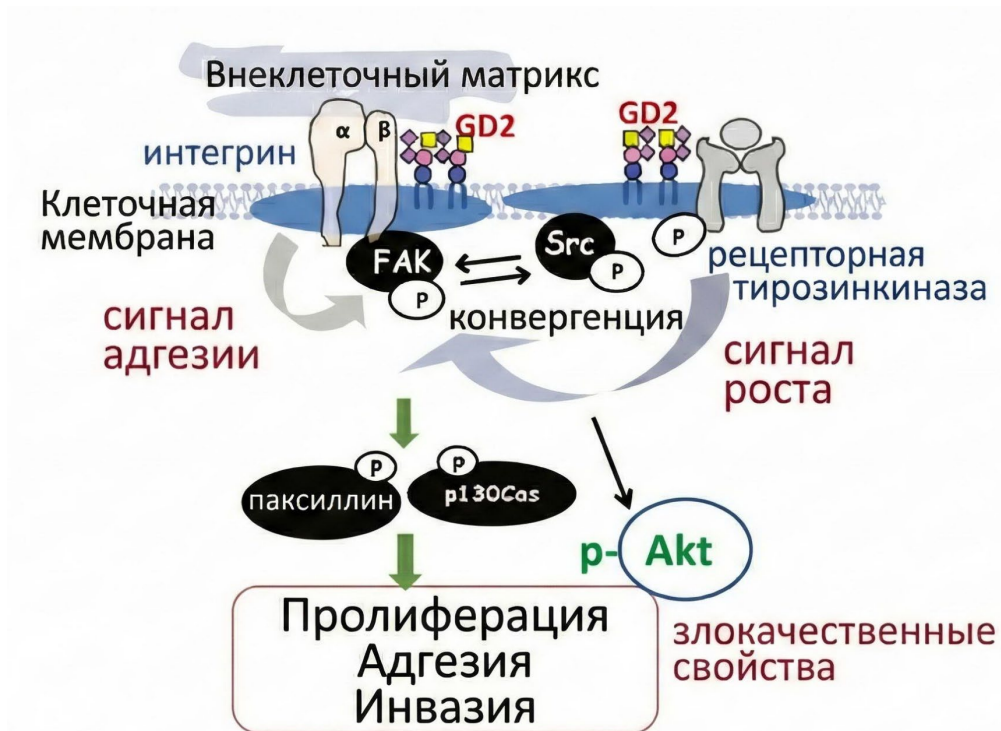


Рисунок 1.3. Активация сигнальных путей, ассоциированных с дисиалированными ганглиозидами *GD2/GD3*. Ганглиозиды усиливают сигналы посредством образования молекулярных кластеров с интегринами и рецепторными тирозинкиназами в липидных рафтах. Конвергенция сигналов адгезии и сигналов роста происходит под рафтами. На основе [55].

Одними из наиболее хорошо охарактеризованных *цис*-партнёров GD2 являются интегрины – семейство гетеродимерных рецепторов адгезии опосредующих взаимодействие клеток с компонентами внеклеточного матрикса (ECM). Интегрины лишены собственной ферментативной активности, однако при кластеризации инициируют передачу сигналов в клетку посредством таких молекул, как киназа фокальных контактов (ФАК) и киназы семейства Src (в частности, Yes и Lyn). Регуляция экспрессии интегринов нередко нарушена при злокачественной трансформации, что способствует эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT), повышению миграционного потенциала и выживанию клеток в нетипичном микроокружении.

GD2 и GD3 способствуют прикреплению клеток к белкам ECM, тогда как моноклональные антитела (МАТ) к этим ганглиозидам подавляют адгезию опухолевых клеток меланомы и нейробластомы к белкам внеклеточного матрикса [58]. В ряде работ продемонстрирована локализация GD2 (и GD3) в фокальных контактах, а также формирование тримерных комплексов GD2–интегрин–ФАК [59], что, в частности, приводит к активации сигнального пути MAPK [60]. В клетках остеосаркомы, сверхэкспрессирующих GD3-синтазу, наблюдается сильное

фосфорилирование FAK и Lyn, что приводит к вовлечению в процесс опухолевого роста паксиллина, являющегося ключевой структурой, формирующей связь между внеклеточными матриксом и актиновым скелетом [61]. Эксперименты по ко-иммунопреципитации, проведенные на тканях головного мозга крыс, а также на модифицированной клеточной линии СНО, сверхэкспрессирующей GD3-синтазу, продемонстрировали прямое взаимодействие между GD3 и Lyn, активируя Lyn и нисходящий сигнальный путь MAPK [62]. Взаимосвязь GD2 с FAK и последующая активация еще одного пролиферативного сигнального пути PI3K/Akt/mTOR были также описаны в ряде исследований на клетках глиомы [63], остеосаркомы [64] и ТНПМЖ [65].

В недавнем исследовании Furukawa и коллег [66], где был применен метод мечения EMARS/MS, позволяющий идентифицировать молекулы, кластеризованные с определенным антигеном на клеточной поверхности живых клеток [67], было показано, что в клетках меланомы человека ганглиозид GD2 образует комплекс с интегрином $\beta 1$ в составе липидных рафтов, функционируя как усилитель интегрин-опосредованного сигналинга. Нокдаун интегрин $\beta 1$ в GD2-положительных клетках приводил к утрате злокачественного фенотипа, в частности способности к адгезии и пролиферации. Примечательно, что прямое связывание GD2 с анти-GD2 мАт оказывало выраженное ингибирующее действие на адгезию клеток меланомы, воспроизводя эффект нокдауна интегрин $\beta 1$. Интересные результаты также получены в контролируемой модели меланомы, которая экспрессировала по одному доминирующему типу ганглиозида в идентичном клеточном контексте [68]. В данном исследовании GD2 и GD3 стимулировали клеточную пролиферацию значительно сильнее, нежели ряд моносиалоганглиозидов. При этом GD3-экспрессирующие клетки характеризовались повышенной инвазией, а GD2-экспрессирующие клетки специфически индуцировали усиление клеточной адгезии (к коллагену I типа) и снижение скорости миграции. Полученные результаты позволили авторам предположить, что GD2 одновременно стимулирует клеточный рост и обуславливает переход клеток к фенотипу стабильного прикрепления – явлению, потенциально значимому в контексте метастатической колонизации или фиксации в нише, но не на этапе первичной инвазии [55].

Ганглиозиды GD2 и GD3 также способны взаимодействовать с рецепторными тирозинкиназами (RTK) – регуляторами роста, выживаемости и подвижности клеток – и активировать связанные с ними сигнальные пути. Наглядным примером подобного взаимодействия служит рецептор фактора роста гепатоцитов (с-Met). Так, в клетках трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 было показано, что сверхэкспрессия GD3-синтазы приводит к конститутивной продукции ганглиозидов GD2 и GD3, а также к ассоциации GD2 и с-Met на клеточной мембране. Образование комплекса GD2-с-Met обуславливало конститутивную активацию с-Met в условиях нутриентной депривации (в отсутствие его лиганда фактора роста гепатоцитов, HGF), что сопровождалось активацией сигнальных путей MAPK и

PI3K/Akt/mTOR. Более того, нокдаун GM2/GD2-синтазы эффективно снижал как уровень экспрессии GD2, так и степень фосфорилирования c-Met, сводя на нет пролиферативный фенотип [69, 70].

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR/HER1) является еще одной RTK, активность которой может модулироваться ганглиозидами. Данных о непосредственном взаимодействии между GD2 и EGFR к настоящему моменту немного, однако GD3 способен связываться с EGFR на клеточной мембране и предотвращать его даунрегуляцию. Экспрессия GD3 в нейрональных стволовых клетках поддерживает рецептор в активированном состоянии, обеспечивая сохранение пролиферативного потенциала клеток [71]. Аналогичная закономерность выявлена в глиобластоме: высокий уровень экспрессии GD3 коррелирует с активацией EGFR и усилением стволовых свойств опухолевых клеток [72]. GD3 ко-локализуется с EGFR и препятствует его лизосомальной деградации в клетках рака молочной железы, тем самым пролонгируя его рецепторную сигнализацию с плазматической мембраны [73]. По сути, в контексте регуляции EGFR, GD3 действует как функциональный антагонист ганглиозида а-серии GM3 – своего непосредственного предшественника в цепи биосинтеза ганглиозидов. GM3 физически связывается с гликозилированным внеклеточным доменом EGFR и блокирует конформационные перестройки, необходимые для димеризации рецептора и последующего аутофосфорилирования внутриклеточного тирозинкиназного домена, тем самым подавляя рецепторную активность EGFR даже в присутствии его лиганда [74, 75]. GD3, напротив, усиливает сигнализацию EGFR, стабилизируя рецепторные кластеры в рафтах.

Помимо участия в механизмах внутриклеточной сигнализации, ганглиозид GD2, экспрессируемый на поверхности опухолевых клеток, способен вступать в *транс*-взаимодействия с рецепторами иммунных клеток и подавлять их противоопухолевую активность. Важную роль здесь играют взаимодействия ганглиозидов с представителями семейства Siglec (Ig-подобных лектинов, связывающих сиаловые кислоты), которые экспрессированы, в частности, на NK-клетках и макрофагах. Так, Siglec-7 и Siglec-9 идентифицированы как рецепторы, связывающие ганглиозиды опухолевых клеток, при этом Siglec-7 специфически взаимодействует с остатками α 2,8-связанной дисиаловой кислоты ганглиозидов b-серии [76]. Было показано, что взаимодействие Siglec-7/9 на NK-клетках с содержащими сиаловые кислоты лигандами опухолевых клеток, включая ганглиозиды, непосредственно подавляет цитотоксическую активность NK-клеток [77]. Theruvath et al. [78] продемонстрировали, что ось GD2–Siglec-7 служит в качестве сигнала «не ешь меня» в сингенных и ксенографтных мышинных моделях нейробластомы, показав, что блокирование данного взаимодействия (посредством Fc-инертного варианта анти-GD2 mAb dinutuximab) значительно усиливает фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами, особенно в условиях

комбинации с блокадой белка CD47 на клетках опухоли. CD47 является контрольной точкой иммунитета, экспрессия которого на опухолевых клетках и связывание с рецептором SIRP α на макрофагах ингибирует их фагоцитарную активность, а CD47-специфичные антитела проходят клинические исследования в терапии рака [79]. Вместе с тем, если опухолевые клетки параллельно задействуют Siglec-рецепторы на иммунных клетках, изолированная блокада CD47 может оказаться недостаточной для полноценной активации фагоцитоза, в то время как комбинация с блокадой GD2 может позволить повысить эффективность терапии.

Таким образом, ганглиозид GD2 вовлечен в механизмы устойчивости опухолей к гибели, а также участвует в процессах их пролиферации, адгезии и инвазии.

1.2. Противоопухолевые антитела: форматы, механизмы действия и выбор мишеней для терапии.

Со времени выхода на рынок первого моноклонального антитела в 1986 году, CD3-специфичного мышинового антитела Orthoclone OKT3 для предотвращения отторжения трансплантата почки, область терапевтических антител претерпела огромные изменения, и на конец 2024 года более 200 различных препаратов на основе антител было одобрено регуляторами для терапии широкого ряда заболеваний, а еще 1400 молекул проходили клинические исследования [80]. Около половины одобренных препаратов на основе антител применяются в онкологии [81]. Большинство этих препаратов представляют собой «канонические» полноразмерные антитела изотипа IgG. Однако в последние годы наблюдается устойчивый рост числа антител неканонических форматов, вступающих в клинические исследования, а начиная с 2021 года доля антител неканонических форматов среди препаратов, ежегодно впервые включаемых в клинические исследования, превышает 50%. Наиболее представленными неканоническими форматами в этих исследованиях являются конъюгаты антител с лекарствами (ADC), биспецифичные антитела и конъюгаты антител с белками неиммуноглобулинового происхождения (**рисунок 1.4**).

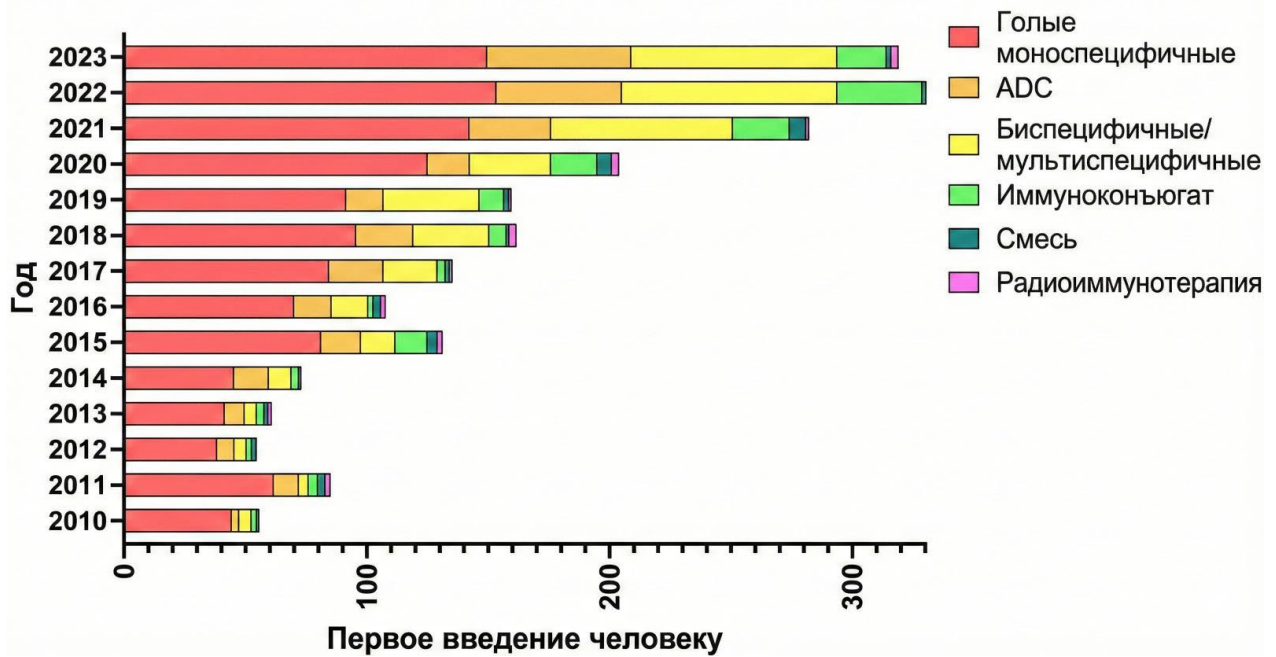


Рисунок 1.4. Новые препараты на основе антител, впервые включаемые в клинические исследования (классификация по форматам). ADC – конъюгат антитела с лекарством (включая биспецифичные ADC); иммуноконъюгат – конъюгат антитела с белком неиммуноглобулинового происхождения либо с иной молекулой, не являющейся цитотоксическим лекарством, радиоизотопом или хелатором [80].

Антитела (или иммуноглобулины) являются секреторной формой В-клеточного рецептора. Они состоят из двух типов полипептидных цепей – тяжелых (H) и легких цепей (L) (см. **рисунок 1.5**). У человека и других млекопитающих существует пять основных изоформ иммуноглобулинов, которые отличаются друг от друга константными областями тяжелых цепей: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, каждый из которых несет свою тяжелую цепь – α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Также существует два типа легких цепей иммуноглобулинов: каппа (κ) и лямбда (λ) [82].

С помощью гидролиза ферментом папаином из антитела изоформа IgG могут быть получены его функциональные группы – антиген-связывающий фрагмент (Fab), ответственный за специфичность антитела, и константный фрагмент (Fc; альтернативное название – кристаллизующийся, легко формирующий кристаллы после гидролиза папаином), который обуславливает эффекторные функции антитела. Все цепи состоят из переменных (V) доменов, в которых находятся CDR-участки, отвечающие за специфичность к конкретному антигену, а также константных (C) доменов. Тяжелая цепь также включает шарнирную область – гибкий участок цепи, располагающийся между константными доменами C_H1 и C_H2, и позволяющий Fab-фрагментам антитела изменять ориентацию и эффективно связывать антигенные эпитопы.

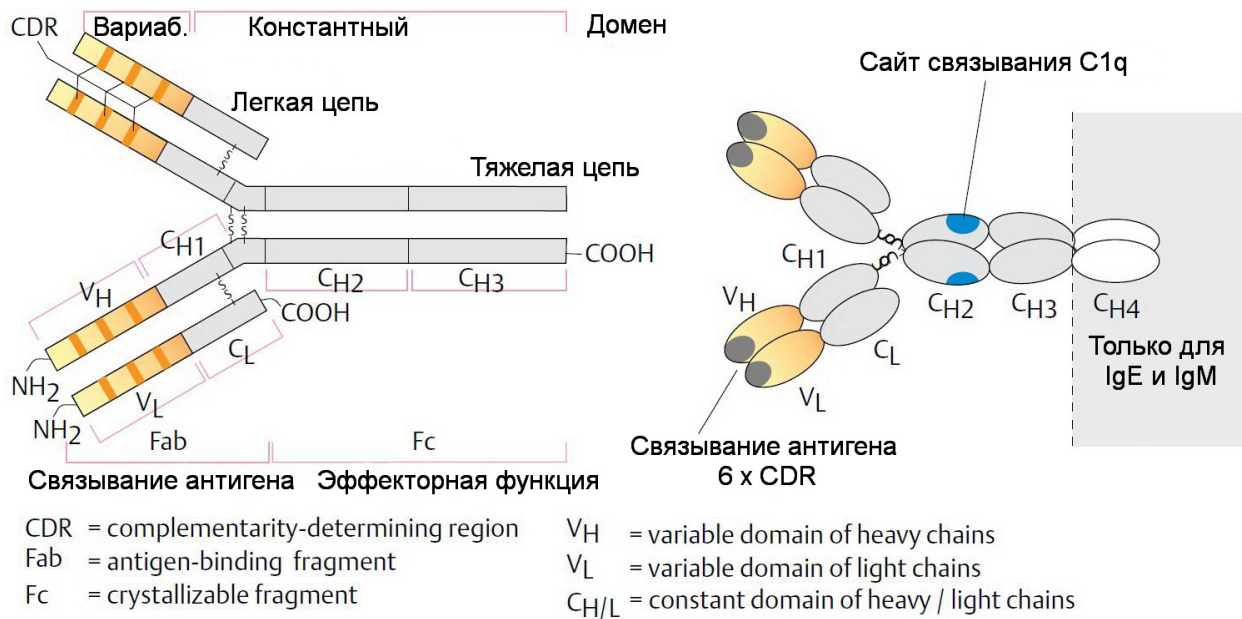


Рисунок 1.5. Структура человеческих антител. Слева изображен иммуноглобулин подкласса IgG1, образующий 4 межцепочечные дисульфидные связи. Внутри каждого домена IgG формируется еще по одной дисульфидной связи, которые характеризуются повышенной стабильностью. На основе [83].

Иммуноглобулины составляют около 20% всех белков крови по массе, в то время как самый распространенный изотип IgG – 80% от их общего количества. IgG является не только самым распространенным иммуноглобулином в организме, но и наиболее широко используемым в терапевтических целях. Практически все терапевтические антитела, представленные на рынке на сегодняшний день, а также молекулы на различных стадиях клинических исследований получены на основе изотипа IgG. IgG в свою очередь подразделяется на четыре подкласса: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Они различаются γ -цепями, которые обозначаются индексами $\gamma 1 - \gamma 4$.

Мономер человеческого IgG1 имеет молекулярную массу около 150 кДа, а N-гликозилирование домена CH2 его Fc-фрагмента может увеличить массу молекулы вплоть до 170 кДа [84]. Цистеины формируют 4 дисульфидные связи между отдельными полипептидными цепями иммуноглобулина IgG1. Аналогичное количество дисульфидных связей содержится в молекуле подкласса IgG4, при этом в молекулах IgG2 и IgG3 в районе шарнирного региона содержится большее количество цистеинов. Наибольшей массой среди всех подклассов обладает IgG3, поскольку он имеет шарнирный регион наибольшего размера, где формируется ряд дополнительных дисульфидных связей, а также может происходить частичное O-гликозилирование в дополнение к N-гликозилированию Fc-фрагмента [85]. IgG3 особенно сильно связывает комплемент [83]. При этом IgG3 обычно не рассматривается в терапии ввиду повышенной доступности шарнирного региона для протеолиза, наиболее короткого среди всех

подклассов времени полужизни в крови (у человека, около 7 дней против 21 дня для остальных подклассов), а также наличия полиморфизмов, увеличивающих его иммуногенность [86, 87].

Первым успехом мАт в клинической практике стали мышинные антитела, полученные с помощью гибридомной технологии. Несмотря на это, проблемы, связанные с существенными различиями человеческой и мышинной иммунных систем, сильно ограничивают применение данного типа антител. Среди основных возникающих проблем – развитие иммунитета против самого мышинного мАт (таких как аллергические реакции и анафилактический шок), быстрое выведение из организма, и недостаточно сильная специфичность и иммуногенность мышинных мАт для запуска механизмов цитотоксичности.

Широкое применение терапевтические мАт получили после распространения технологий генной инженерии, которые позволили менять последовательность аминокислот мышинных антител с тем, чтобы они проявляли иммунологические свойства, схожие с человеческими IgG. Процесс производства таких «очеловеченных» антител состоит из выделения генов, ответственных за синтез мАт, обладающих определенной специфичностью, из иммортализованных плазматических клеток мыши (либо из иных нечеловеческих антитело-продуцирующих клеток), а затем создания на их основе рекомбинантной ДНК, способной к экспрессии в клеточных культурах. Наиболее широко используются химерные антитела, в которых нечеловеческое происхождение имеют лишь V_H и V_L домены, а также гуманизированные антитела, которые по структуре практически идентичны человеческим, за исключением антиген-связывающих CDR-участков. Такие мАт реже распознаются иммунной системой хозяина как чужеродный антиген, имеют время полужизни схожее с человеческими IgG и высокое сродство к эффекторным клеткам человеческой иммунной системы [88].

С целью устранения этапа гуманизации разработаны подходы, позволяющие напрямую получать полностью человеческие антитела. Так, человеческие антиген-связывающие последовательности могут быть получены *in vitro* посредством фагового дисплея и селекции; библиотеки фрагментов человеческих антител (например scFv-фрагменты) генетически конъюгируют с белками оболочки нитевидных бактериофагов таким образом, что связывание антигена обеспечивает обогащение целевой последовательности, включая идентификацию крайне редких клонов в ходе нескольких итераций селекции. Анти-TNF- α adalimumab стал первым терапевтическим антителом, полученным методом фагового дисплея и одобренным для клинического применения в 2002 году [89]. Альтернативным подходом служат трансгенные мышинные модели (например, платформа XenoMouse), созданные путём замены эндогенных иммуноглобулиновых локусов мыши сегментами генов тяжёлых и лёгких цепей человека. Данные модели задействуют естественный иммунный аппарат организма-хозяина для формирования полностью человеческого гуморального ответа при иммунизации [90]. В то время

как фаговый дисплей позволяет жестко контролировать условия селекции для получения антител к токсичным или высококонсервативным мишеням, трансгенные системы обеспечивают получение кандидатов с высокой аффинностью, достигнутой в результате созревания антител *in vivo*.

Механизмы действия противоопухолевых антител.

Антитела способны убивать целевые опухолевые клетки, вызывая антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) и комплемент-опосредованную цитотоксичность (complement-mediated cytotoxicity, CMC), а также посредством индукции прямой клеточной гибели. Выделяют и другие механизмы [91, 92]. Определение того, какой из этих механизмов (или их комбинация) отвечает за смерть клетки в каждом конкретном случае, до сих пор является непростой задачей. Кроме этого, антитела могут быть использованы для доставки в опухоль цитотоксических молекул (таких как лекарства, радиоизотопы или токсины), которые напрямую убивают опухолевую клетку. Отдельно следует выделить эффекты антител на клетки иммунной системы, кровеносные сосуды и строми опухоли. Ряд ключевых механизмов действия голых антител представлен на **рисунке 1.6**.

Механизм ADCC инициируется при распознавании Fc-фрагмента антитела активирующими Fc-рецепторами (FcγR; прежде всего FcγRIIa и FcγRIIIa) эффекторных иммунных клеток – преимущественно NK-клеток, макрофагов и нейтрофилов. Образование данного комплекса опосредует фосфорилирование иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAMs) во внутриклеточных адаптерных белках рецепторов, что приводит к направленной секреции перфорины и гранзимов в иммунный синапс и последующей индукции гибели опухолевой клетки преимущественно через каспазо-зависимый апоптоз. В то же время, покрытые моноклональными антителами таргетные клетки могут индуцировать производство и секрецию цитокинов эффекторными клетками, экспрессирующими Fcγ-рецепторы. Эти цитокины затем активируют другие иммунные клетки в микроокружении опухоли [93]. Таким образом, активация иммунных клеток посредством FcγR ведет к запуску механизма ADCC, а также генерирует цитокины, которые контролируют рост опухоли другими способами. ADCC наиболее эффективно запускается подклассом антител IgG1. IgG3 также сильно связывается с Fcγ-рецепторами, и в ряде экспериментальных моделей превосходит IgG1 по индуцированию эффекторных функций [86].

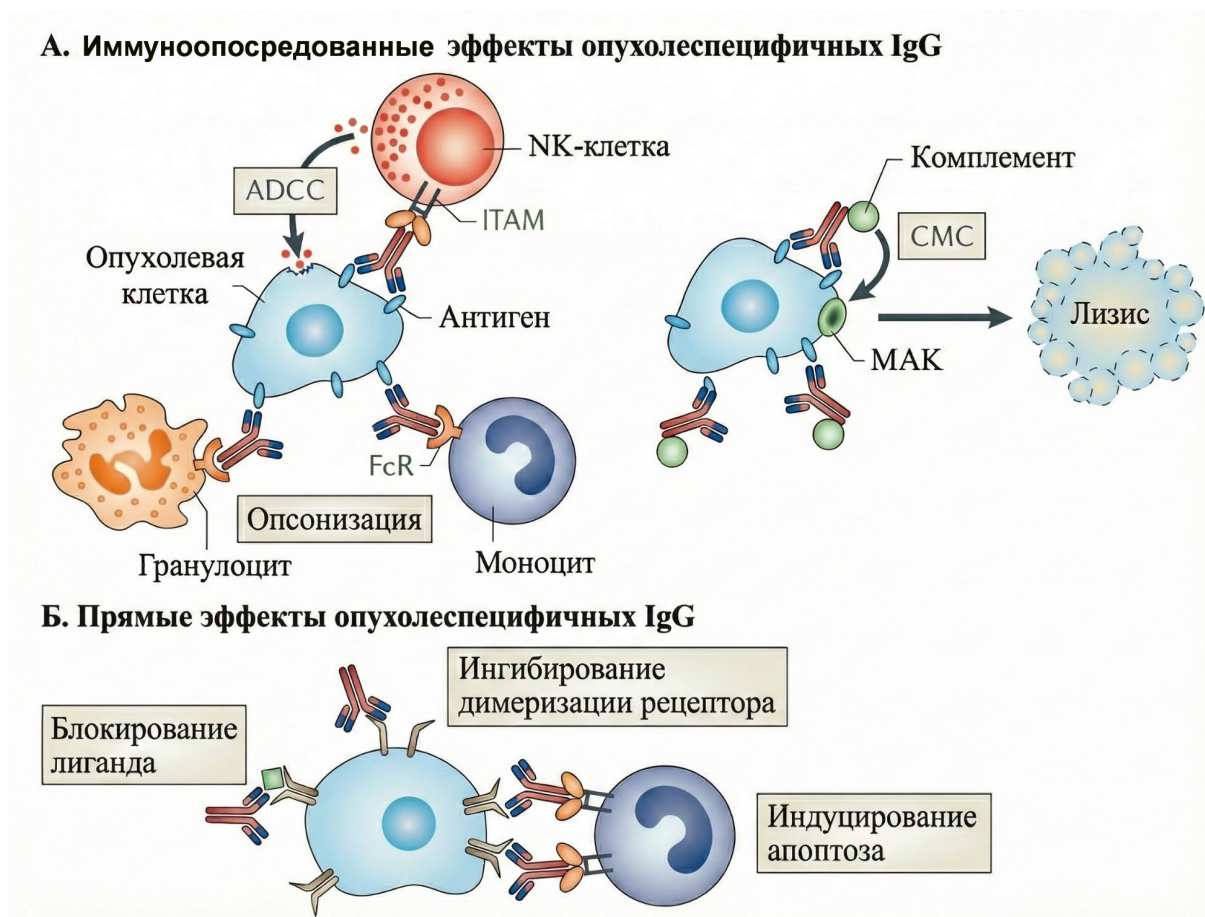


Рисунок 1.6. Механизмы действия противоопухолевых антител. А. Механизм ADCC – антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность; ITAMs – иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы иммунных клеток; механизм ADCP – опсонизация и антитело-зависимый клеточный фагоцитоз; механизм CMC – комплемент-опосредованная цитотоксичность, приводящая к формированию мембрано-атакующего комплекса (МАК). Б. Антитела индуцируют механизмы прямой клеточной гибели без участия иммунной системы, активируя либо ингибируя сигналы, поступающие в клетку. На основе [92].

ADCC непосредственно влияет на выживаемость онкологических пациентов. Несколько групп исследователей показали, что эффективность анти-CD20 мАт rituximab в терапии лимфомы значительно выше в случае «высокоактивных» полиморфизмов Fc-рецепторов – замен конкретных аминокислот на более эффективные [94, 95]. Эти данные указывают на то, что взаимодействие Fc-фрагмента антител с FcγR иммунных клеток обуславливает по крайней мере некоторую долю клинической эффективности rituximab. В ряде исследований FcγRIIIa-131H полиморфизмы рецепторов миелоидных иммунных клеток благоприятно сказывались на частоте клинического ответа в случае использования анти-EGFR cetuximab при лечении рака толстой кишки и в случае анти-HER2 trastuzumab при лечении рака молочной железы [96, 97].

Несмотря на это, отсутствуют системные доказательства того, что терапия человеческих опухолей голыми мАт индуцирует обильную инфильтрацию солидных опухолей лейкоцитами

хозяина. Такой эффект наблюдается, например, в случае применения биспецифичных антител, которые привлекают иммунные клетки в микроокружение опухоли, физически связывая CD3 рецептор Т-лимфоцита и антиген на опухолевой клетке [98]. Следовательно, механизм ADCC можно рассматривать как эффективный инструмент, способный индуцировать умеренный цитотоксический противоопухолевый эффект, что в свою очередь ведет к презентации антигенов опухолевой клетки профессиональным антиген-презентирующим клеткам и последующей индукции более сильного опухолеспецифичного Т-клеточного ответа [99, 100].

Индукция ADCC с помощью mAb имеет ряд ограничений. Во-первых, аффинность связывания Fc-фрагмента антитела с активирующими Fcγ-рецепторами крайне важна для проявления цитотоксического эффекта, однако большинство эффекторных клеток имеют на своей поверхности низкоаффинные варианты рецепторов. Поэтому индукция ADCC, как правило, требует кластеризации IgG на поверхности мишени, что обеспечивает кросс-линкинг FcγR и запуск сигнальных каскадов. Во-вторых, IgG гликозилированы по сайту Asn297 домена C_H2 Fc-фрагмента, и олигосахаридный компонент влияет на связывание с рецептором. Наличие остатков фукозы в составе олигосахаридной цепи понижает эффективность ADCC, в то время как афукозилирование способно усилить ADCC [101, 102]. По этой причине в разработке новых противоопухолевых антител, например анти-CD20 obinutuzumab, часто используют стратегию модификации фукозилирования (fucosylation modification), которая представляет собой удаление фукозных остатков с N-гликанов Fc-фрагмента антитела, что приводит к усилению связывания антитела с FcγRIIIa (CD16a) рецепторами NK-клеток [103].

Система комплемента представляет собой набор белков (многие из которых являются протеолитическими ферментами), постоянно присутствующих в крови и осуществляющих гуморальную защиту организма от чужеродных агентов. Способность отличать своё от не своего сводится к тому, что система комплемента стремится активироваться везде, где только можно, но клетки организма в норме имеют регуляторные механизмы, препятствующие её активации. Белки системы комплемента, в основном продуцируемые печенью, составляют примерно 5% глобулиновой фракции плазмы крови.

Первые исследования, демонстрирующие возможность фиксации комплемента с последующим усилением антитело-опосредованного цитолиза, были проведены более столетия назад. Они затрагивали эффект яда кобры на лизис красных клеток и бактерий и были проведены в то время, когда понимание об антителах и системе комплемента были весьма ограниченными [104].

Как и в случае ADCC, различные изотипы антител индуцируют развитие СМС с разной эффективностью [105]. Хотя IgM наиболее эффективно запускают механизмы СМС в сравнении

с другими изотипами антител, они практически не используются в клинической практике по причине своего большого размера, и, следовательно, слабого проникновения в ткани. Подклассы IgG1 и IgG3 также очень эффективны в индуцировании СМС по классическому пути активации комплемента. Каскад реакций начинается с того, что взаимодействие антитела с антигеном на поверхности клетки приводит к улучшению стерических условий для узнавания специфических сайтов связывания C_H2 доменов антител субъединицей C1q (одной из трех субъединиц белка C1 системы комплемента). Результатом каскада реакций является формирование мембрано-атакующего комплекса (МАК), который образует поры в плазматической мембране клетки, через которые свободно проходят вода и ионы. Клетка погибает в первую очередь из-за разницы осмотического давления внутри клетки и за её пределами. Белки системы комплемента также способны привлекать эффекторные иммунные клетки посредством хемотаксиса.

Механизм СМС играет существенную, а в ряде случаев даже первостепенную роль в противоопухолевой активности антител в гематологических опухолях, где таргетные клетки наиболее доступны для сыворотки крови [106], однако принято считать, что он вносит незначительный вклад в эффекты антител, специфичных к антигенам солидных опухолей [107]. В то же время, СМС генерирует различные факторы, которые способствуют развитию механизмов ADCC и ADCP.

Способность антител запускать механизм СМС сильно зависит от количества копий таргетного антигена на поверхности клетки, и даже от локальной плотности антигена на определенном участке поверхности. Любое из этих двух условий способно обеспечить высокую плотность антитела, необходимую для активации C1q, которому требуется одновременно связаться как минимум с двумя IgG для запуска каскада реакций классического пути активации комплемента. Так, способность анти-CD20 mAb rituximab убивать клетки хронической В-клеточной лимфоцитарной лейкемии, изолированные из пациентов, посредством механизма СМС определяется уровнями экспрессии CD20 клетками [108]. Rituximab вылечивает мышиную лимфому EL4, трансфицированную человеческим CD20, у иммунокомпетентных мышей, но не проявляет активности в случае аналогичного эксперимента, но с сингенными нокаутными по C1q мышами [109]. Даже антитела одного подкласса, специфичные к одному и тому же антигену, могут различаться по способности связывать комплемент [110]. В то время как rituximab кросс-сшивает тетрамеры CD20 и эффективно фиксирует комплемент, obinutuzumab (оба анти-CD20 IgG1 с человеческими константными доменами) не проявляет этих свойств [111].

Прямая индукция клеточной гибели посредством mAb чаще всего вызывается тем, что антитела блокируют связывающийся с рецептором активирующий лиганд, необходимый клетке для выживания, ингибируют мультимеризацию рецептора и таким образом препятствуют

получению активирующего сигнала, либо индуцируют апоптотический сигнал, связывая рецепторы друг с другом посредством Fc γ R-экспрессирующих клеток (**рисунок 1.6, Б**) [92]. Среди примеров мишеней антител, вызывающих прямую гибель клеток, можно особо выделить рецепторы факторов роста и рецепторы смерти.

На рецепторах факторов роста начинаются сигнальные каскады, индуцирующие процессы пролиферации, выживания и ангиогенеза, что способствует развитию опухолей и лекарственной устойчивости. Как и следует из их названия, эти рецепторы связывают белковые/пептидные факторы роста. К таким рецепторам относятся, в частности, рецепторы семейства эпидермальных факторов роста (EGF/ErbB) и семейства факторов роста эндотелия (VEGFR), а противоопухолевые терапевтические мАТ используются в качестве антагонистов этих рецепторов, связываясь с ними либо их лигандами, и блокируя проведение сигнала в клетку [112, 113].

Два рецептора семейства EGF/ErbB – EGFR/HER1 и ErbB2/HER2 – вовлечены в развитие большого количества опухолей человека [114, 115]. Рецептор EGFR активируется связыванием с рядом специфичных лигандов, в частности с EGF и TGF- α . Ключевым механизмом действия анти-EGFR антител cetuximab и panitumumab, которые широко используются в клинической практике колоректального рака, считается ингибирование лиганд-рецепторного взаимодействия между EGFR и его лигандами, что приводит к блокированию проведения пролиферативных сигналов в клетку [116]. При этом иммуноопосредованные механизмы действия для этих двух антител выражены неодинаково: так cetuximab (IgG1) эффективно запускает ADCC, а panitumumab (IgG2) обычно характеризуют как антитело со слабой ADCC-активностью. Рецептор HER2 характеризуется гиперэкспрессией в опухолях молочной железы и желудка, а уровень его экспрессии на опухолевых клетках может превышать таковой в нормальных тканях в десятки раз. Природные лиганды данного рецептора не идентифицированы, однако известно, что гомодимеризация HER2, а также его гетеродимеризация с другими членами семейства – прежде всего с HER3 и EGFR – приводят к усилению пролиферативных процессов в клетке. Анти-HER2 мАТ trastuzumab и pertuzumab подавляют рост опухолевых клеток как с помощью запуска иммуноопосредованных противоопухолевых механизмов (ADCC, ADCP и СМС), так и в ходе индукции прямой клеточной гибели [117, 118]. Ключевое различие в их механизмах действия обусловлено разными сайтами связывания на HER2: trastuzumab взаимодействует с внеклеточным доменом 4 (ECD4), а pertuzumab – с внеклеточным доменом 2 (ECD2) рецептора. Отсутствие конкуренции за эпитоп позволяет использовать данные мАТ в комбинации, обеспечивая синергичное ингибирование димеризации рецепторов и более эффективную блокаду онкогенного сигналинга.

Рецепторы смерти TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5) также являются важными мишенями противоопухолевой терапии антителами. Их лигандом служит TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) – цитокин суперсемейства факторов некроза опухоли, экспрессируемый преимущественно иммунными клетками. TRAIL существует как в мембраносвязанной форме, так и в виде секретируемого белка, образующегося при протеолитическом расщеплении. Ключевой характеристикой TRAIL в контексте терапии рака является его избирательная цитотоксическая активность в отношении многих типов опухолей при относительно низкой токсичности для нормальных тканей. DR4- и DR5-специфичные агонистические антитела (и другие функциональные агонисты TRAIL) способны индуцировать гибель широкого спектра опухолевых клеток, вызывая кластеризацию рецепторов и активацию каспаза-8-зависимого апоптоза [119, 120].

Выбор мишеней для терапии антителами.

Моноклональные антитела можно получить к огромному количеству антигенов на опухолевых клетках, но далеко не все из них являются интересными для терапии рака. Свойства, которые делают антигены привлекательными мишенями для противоопухолевой терапии антителами – это плотность и постоянность экспонирования таргетной молекулы на поверхность опухолевых клеток, ограниченное присутствие таргетной молекулы на здоровых клетках, низкая вероятность появления антиген-отрицательных опухолей, а также полное или почти полное отсутствие молекулы в крови и лимфе организма. Секреция / шеддинг антигена должны быть минимальны, поскольку растворимый антиген может связываться с мАТ в кровотоке и препятствовать связыванию его достаточного количества с опухолью [92]. В последнее время, к поверхностным или секретируемым мишеням (около 20–30% протеома) добавились внутриклеточные мишени, например мутантные формы KRAS или p53, которые можно таргетировать посредством использования антител, имитирующих Т-клеточный рецептор (TCR-like antibodies) [121, 122].

В случае, если механизм действия антитела представляет собой ADCC либо CMC, комплекс антиген-антитело не должен подвергаться быстрой интернализации, поскольку для работы данных механизмов необходим доступ иммунных клеток и белков системы комплемента соответственно к Fc-фрагменту антитела. Однако, в случае использования мАТ, доставляющих к опухолям различные цитотоксические молекулы, а также тех, первичным механизмом действия которых является даунрегуляция поверхностных рецепторов, выраженная интернализация комплекса антитело-антиген, напротив, обычно служит благоприятным терапевтическим фактором [86].

Выбор таргетных антигенов для терапевтических мАТ в упрощенном варианте может быть разбит на два основных подхода. Первый подход предполагает использование антител к так называемым «валидированным» мишеням, что обусловлено либо однозначной клинической эффективностью более ранних мАТ к этим же мишеням, либо наличием экспериментальной валидации мишени (эффективность в *in vitro* / *in vivo* моделях, а также генетическая валидация у человека – наличие причинной связи между функцией мишени и риском/течением болезни [123]). Данная стратегия сводится к разработке новых поколений антител, специфичных к тем же самым молекулам, но нацеленных на другие эпитопы и / или работающих по другим механизмам действия. Часто меняются исключительно свойства самого мАТ (сниженная иммуногенность; повышенная/сниженная аффинность к мишени; Fc-инжиниринг – усиление ADCC через афукозилирование либо, наоборот, Fc-сайленсинг мутациями типа LALA для отключения FcγR/C1q [124]).

Вторым подходом к выбору таргетных антигенов является идентификация новых или менее изученных молекул. Традиционный «функциональный» подход предполагает, что опухолеассоциированные антигены будут отобраны с помощью какого-либо функционального скрининга. *In silico* скрининг приобретает все большее значение как при поиске мишеней, так при подборе форматов антител и прогнозировании успеха терапии [125, 126]. Даже формально удачный поверхностный антиген может представлять из себя неподходящую мишень для терапии из-за внутриопухолевой гетерогенности, различий между первичной опухолью и метастазами, а также его экспрессии клетками микроокружения опухоли. Поэтому для приоритизации мишеней всё чаще используют пространственную транскриптомику и протеомику, с целью установить, в каких именно клетках находится мишень, и какие ниши могут стать источником токсичности или резистентности к терапии [127, 128, 129].

Выбор таргетного антигена остается определяющим фактором терапевтической эффективности препаратов на основе антител. Вместе с тем распространение «неканонических» форматов антител, таких как конъюгаты антител с лекарствами, биспецифичные антитела [130], условно активируемые в опухоли форматы антител [131] и фрагменты антител со значительно отличающимся фармакокинетическим профилем в организме, смещает акцент с поиска универсально хорошей мишени к подбору мишеней, биологические свойства которых соответствуют механизму действия конкретной терапевтической платформы.

1.3. Конъюгаты антител с лекарствами в терапии рака.

Конъюгат антитела с лекарством (ADC) включает опухолеспецифичное моноклональное антитело, низкомолекулярный цитотоксический агент, а также линкер, который их соединяет.

Создание хорошего ADC требует оптимизации каждого компонента – антитела, линкера и метода конъюгации, и лекарства – наряду с соотношением лекарства к антителу в составе конъюгата (drug-antibody ratio, DAR), с целью обеспечить баланс между эффективностью и безопасностью.

1.3.1. Антитела и их мишени.

Большинство одобренных для клинического применения ADC получены на основе гуманизированных или полностью человеческих молекул IgG. Подкласс IgG1 является стандартным выбором в разработке, когда требуется вовлечь в противоопухолевые механизмы действия препарата иммунную систему. Практически все ADC на рынке несут IgG1, однако два препарата – анти-CD33 *gemtuzumab ozogamicin* и анти-CD22 *inotuzumab ozogamicin*, применяемые в терапии гематологических опухолей, – получены на основе подкласса IgG4 [87]. Уникальным недостатком IgG4 является его склонность к обмену Fab-фрагментами – процессу, в ходе которого происходит обмен парами тяжелая цепь – легкая цепь между двумя молекулами IgG4, что приводит к появлению биспецифичных антител в кровотоке [132]. Этот обмен обусловлен разрывом дисульфидных связей между тяжелыми цепями, происходит в кровотоке и на поверхности клеток, и может вызывать нежелательные фармакологические эффекты IgG4 и его конъюгатов. Примечательно, что *gemtuzumab ozogamicin* содержит мутацию в шарнирном регионе IgG4, блокирующую обмен Fab-фрагментами [133]. Ни один из одобренных ADC не несет IgG2; хотя этот подкласс может представлять интерес в тех случаях, когда необходимо отсутствие Fc-опосредованных противоопухолевых функций, IgG2 редко используется в ADC из-за его склонности к димеризации и агрегации *in vivo* [134].

Что касается посттрансляционных модификаций, то большинство ADC сохраняют консервативный N-связанный гликан в положении Asn297 Fc-фрагмента, который необходим для эффективного связывания Fcγ-рецепторов. Вместе с тем данный гликановый фрагмент также опосредует взаимодействие с маннозными рецепторами гепатоцитов, потенциально способствуя нецелевому захвату препарата клетками печени [135]. Вследствие этого использование агликозилированных антител приобретает большое распространение как стратегия снижения неспецифического накопления ADC в печени.

Предпочтительными мишенями для ADC являются опухолеассоциированные антигены, которые гомогенно экспрессированы на клетках опухоли. Среди клинически успешных примеров антигенов солидных опухолей следует выделить HER2 (мишень ряда ADC на основе *trastuzumab*), TROP-2 (*sacituzumab govitecan*), нектин-4 (*enfortumab vedotin*), FRα (*mirvetuximab soravtansine*) и c-Met (*telisotuzumab vedotin*). Эти антигены гиперэкспрессированы в определённых типах рака, однако имеют ограниченную экспрессию в нормальных тканях, что

обеспечивает специфичным к ним ADC достаточно широкое терапевтическое окно – диапазон между минимально эффективной и максимально переносимой дозировками.

Помимо высокой специфичности, оптимальная мишень для ADC чаще всего должна обладать способностью к эффективной рецептор-опосредованной интернализации после связывания с антителом – это является необходимым условием для эндоцитоза ADC и его последующего транспорта к лизосомам, где происходит расщепление большинства используемых в одобренных препаратах линкеров и высвобождение лекарства [136, 137]. Экспериментальные данные говорят о наличии прямой корреляции между уровнем экспрессии мишеней опухолями и эффективностью ADC. В то же время, например, показано, что цитотоксическая активность анти-CD22 конъюгата антитела с лекарством класса майтанзиноидов DM1 в широкой панели клеточных линий неходжкинской лимфомы определяется чувствительностью конкретной линии к DM1 в большей степени, нежели уровнем экспрессии мишени [138]. Это свидетельствует о том, что отбор пациентов, основанный исключительно на уровне экспрессии мишени, не может гарантировать эффективность терапии.

1.3.2. Линкеры.

Многие лекарства, используемые в современных ADC, были известны десятилетиями, однако не применялись самостоятельно ввиду их высокой системной токсичности. Клинический успех ADC, наблюдаемый в последние годы, вероятно в первую очередь связан с появлением стабильных в циркуляции, но расщепляемых в опухолях линкеров, а также с внедрением методов эффективной сайт-направленной конъюгации лекарств к антителам.

Линкеры должны обладать достаточной гидрофильностью, чтобы компенсировать негативное влияние лекарств, которые в большинстве случаев являются гидрофобными, на растворимость конъюгата. Важную роль играет и заряд линкера: нейтральные или отрицательно заряженные линкеры, как правило, обеспечивают более высокую стабильность в плазме и снижают неспецифическое поглощение ADC тканями, тогда как положительно заряженные линкеры могут способствовать накоплению конъюгата в печени и почках из-за электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными мембранами клеток [139]. Основные классы линкеров и лекарств, используемые в клинически одобренных ADC, представлены на **рисунке 1.7**.

Линкеры в широком смысле подразделяют на расщепляемые и нерасщепляемые. Нерасщепляемые линкеры (например, тиоэфирный линкер SMCC, используемый в анти-HER2 ADC trastuzumab emtansine (T-DM1)) образуют стабильную связь, устойчивую к деградации в кровотоке, однако высвобождают лекарство только после полного протеолиза антитела в лизосомах клетки-мишени. При этом высвобожденный препарат остается связанным с концевым

аминокислотным остатком антитела – обычно лизином или цистеином, что ограничивает его способность проникать в соседние клетки и уничтожать их (как в случае с T-DM1) [140]. Нерасщепляемые линкеры могут представлять удачную стратегию для максимизации противоопухолевой активности лекарств в ситуациях, когда таргетный антиген экспрессирован на клетках опухоли гомогенно и в высоком количестве [141].

Расщепляемые линкеры (именно они преимущественно используются в современных ADC) разработаны таким образом, чтобы подвергаться деградации под действием опухолеассоциированных факторов – кислых и/или восстанавливающих условий в опухолях, либо внутриклеточных ферментов, характеризующихся повышенной экспрессией в опухолях [134, 142].

Кислоточувствительные / pH-чувствительные линкеры высвобождают лекарство в кислой среде лизосом и эндосом клеток. Гидразоновые pH-чувствительные линкеры использованы в одобренных ADC gemtuzumab ozogamicin и inotuzumab ozogamicin, а TROP2-специфичный sacituzumab govitecan содержит pH-чувствительный карбонатный линкер. Недостатком кислоточувствительных линкеров является повышенный риск преждевременного высвобождения лекарств в кровотоке. Так, FDA-одобренный gemtuzumab ozogamicin был первоначально снят с рынка в 2010 году отчасти ввиду неспецифичной токсичности, однако повторно допущен в клинику в 2017 году в более низкой дозе [143].

Следующая группа расщепляемых линкеров состоит из линкеров, высвобождающих лекарство в восстанавливающих условиях цитозоли клеток. Наиболее распространенными среди них являются дисульфидные линкеры, которые подвергаются расщеплению посредством тиол-дисульфидного обмена с глутатионом, часто присутствующим в клетках опухолей в высоких концентрациях. Вероятность неселективного расщепления дисульфидов в кровотоке уменьшается в случае, если хотя бы один из атомов углерода при дисульфиде является замещенным; это показано на примере одобренного для терапии FR α -специфичного mirvetuximab soravtansine, где дисульфид-содержащий линкер сульфо-SPDB использован для конъюгации майтанзиноида DM4 [144]. Примечательно, что оба упомянутых выше гидразон-содержащих ADC gemtuzumab ozogamicin и inotuzumab ozogamicin также содержат дисульфиды, способные расщепляться в восстанавливающих условиях внутри клетки, однако для них pH-зависимый механизм расщепления принято считать основным.

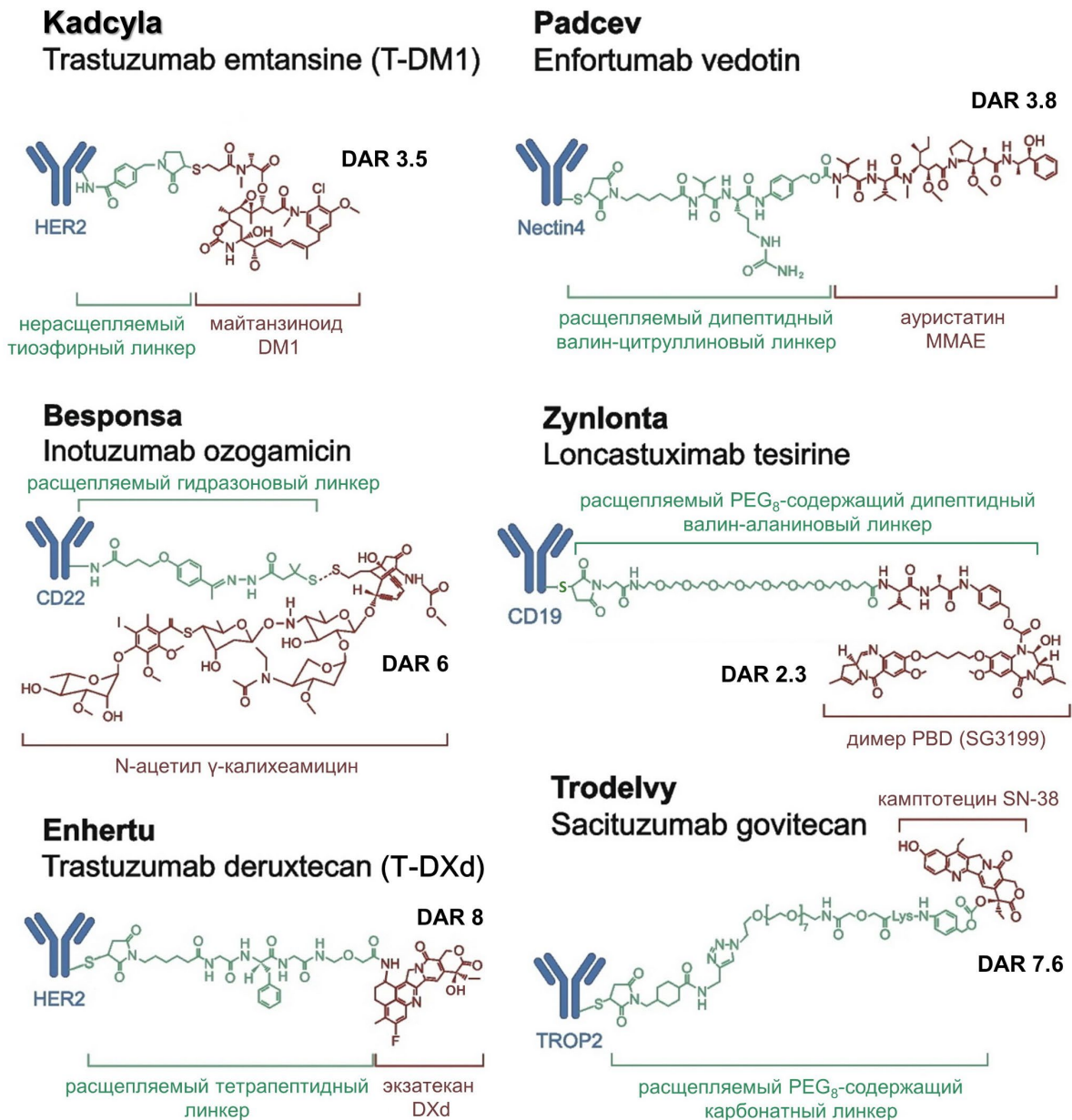


Рисунок 1.7. Примеры конъюгатов антител с лекарствами, одобренных для терапии рака. Представленные ADC включают классы лекарств, ингибирующие активность тубулина (ауристин MMAE, мйтанзиноид DM1), повреждающие ДНК (N-ацетил γ -калихеамицин, димер пирролобензодиазепина SG3199), либо ингибирующие работу топоизомеразы I типа (DXd и SN-38, производные/аналоги камптотецина). DAR – степень пришивки лекарства к антителу, PEG – полиэтиленгликоль. На основе [6].

Расщепляемые ферментами линкеры преимущественно получены на основе пептидных последовательностей, являющихся субстратами специфичных протеаз. Наличие широкого спектра ферментов в клетках человека позволяет подбирать линкеры таким образом, чтобы их гидролиз протекал в клетках опухолей, но не в здоровых тканях. Наиболее широко применяемым расщепляемым сайтом в клинически одобренных ADC является дипептид валин-цитруллин –

субстрат катепсина В, гиперэкспрессируемого многими опухолями. Вместе с тем, и для этого типа линкера показан частичный преждевременный гидролиз с высвобождением лекарства в кровотоке [145, 146]. Дипептид валин-аланин и тетрапептид GGFG также используются в линкерах одобренных для терапии ADC. В состав линкера непосредственно после сайта узнавания ферментом часто включают саморазрушающийся спейсер PABC для того, чтобы облегчить доступ фермента к сайту и обеспечить беспрепятственное высвобождение лекарства. Активно изучаются и другие ферментативно-расщепляемые мотивы, отличающиеся повышенной стабильностью в циркуляции [147], в частности субстраты β -глюкуронидазы [148], β -галактозидазы и легумаина [149].

1.3.3. Методы конъюгации лекарств.

Не менее важным фактором, чем структура линкера, выступают сайт связывания линкера с антителом и методика конъюгации. Все клинически одобренные на начало 2026 года ADC получены с использованием стохастических *методов сайт-направленной конъюгации* лекарств по боковым группам межцепочечных цистеинов (тиол) либо лизинов (ϵ -аминогруппа) антитела. За заметными исключениями, такими как trastuzumab deruxtecan (T-DXd) и sacituzumab govitecan – оба имеют почти гомогенную степень пришивки лекарства к антителу DAR 8 за счет насыщения межцепочечных цистеинов лекарством, – эти методы конъюгации приводят к получению гетерогенной смеси продуктов. Лизин-амидная конъюгация (до 40 доступных лизинов у IgG) химически проста, однако получаемые конъюгаты характеризуются высокой вариабельностью от партии к партии, а ADC с высоким DAR часто нестабильны или неактивны, поскольку пришивка лекарств нарушает фолдинг антитела или связывание с мишенью. Восстановление межцепочечных дисульфидных связей антитела с образованием реакционноспособных тиольных групп обеспечивает до 8 тиолов у IgG1, доступных для конъюгации с малеимид-активированным лекарством, что снижает гетерогенность продукта и оказывает меньшее влияние на связывание с антигеном в сравнении с конъюгацией по лизинам антитела. Вместе с тем само восстановление межцепочечных цистеинов антитела негативно сказывается на его стабильности. Дополнительным ограничением служит нестабильность образующейся тиоэфирной связи, которая способна подвергаться ретро-реакции Михаэля (деконъюгации) в кровотоке – например, вступая в обмен со свободными тиолами сывороточного альбумина, – что приводит к преждевременному высвобождению лекарства [150].

Методы сайт-специфичной конъюгации призваны конъюгировать лекарство по определенному сайту антитела и обеспечить получение гомогенного продукта с контролируемой степенью пришивки лекарства к антителу DAR. Такие стратегии требуют либо применения генной инженерии для введения уникальной реакционноспособной группы в аминокислотную

структуру антитела (например, искусственно встроенных цистеинов или непротеиногенных аминокислот [151]), либо использования (хемо)ферментативных стратегий, нацеленных на уникально доступные сайты антитела (такие как глутамин Q295 или N-связанный гликан в положении N297 Fc-фрагмента антител подкласса IgG1) [152, 153, 154].

Введение в структуру антитела ненативных цистеинов обычно предполагает мутагенез определенных нативных аминокислот (часто серина или аланина) в цистеины. Данный подход обеспечивает формирование строго определённого числа свободных тиольных групп (обычно 2 или 4), а поскольку сайты конъюгации намеренно располагают вдали от функционально критических областей, таких как антиген-связывающие участки и дисульфидные связи, функциональная активность антител в норме сохраняется в полной мере. Широко известным примером выступает технология THIOMAB [155, 156], позволяющая получать ADC с DAR 2 и гомогенностью >90%; такие конъюгаты демонстрируют противоопухолевую активность сопоставимую с ADC с более высоким DAR, полученными посредством стохастических методов конъюгации, и при этом характеризуются более широким терапевтическим окном. В то же время, включение дополнительных цистеинов (или иных реакционноспособных групп) в каркас IgG сопряжено с рисками, поскольку расположение сайта конъюгации может оказывать негативное влияние на укладку самого белка, а также на фармакокинетический профиль и терапевтическую активность получаемых ADC. Известны примеры формирования некорректных дисульфидных связей в антителах, полученных по технологии THIOMAB. На практике это влечет за собой значительную нагрузку по скринингу и оптимизации, которая нередко существенно превышает таковую при использовании традиционных стохастических методов конъюгации по цистеинам/лизинам антитела [157, 158]. Кроме того, наработка таких антител зачастую требует применения специализированных клеточных линий, что создаёт дополнительные регуляторные препятствия. Клинические исследования ряда ADC, полученных на основе антител с ненативными цистеинами, показали, что выигрыш в структурной однородности может достигаться ценой новых рисков, затрагивающих стабильность препарата, переносимость пациентами и усложнение производственного контроля [159].

Методы конъюгации на основе сшивания нативных дисульфидных связей (disulfide re-bridging) привлекли широкое внимание несмотря на такие ограничения, как невысокая эффективность реакции и риск образования нецелевых межцепочечных дисульфидных связей [160]. Аналогично традиционной тиол-малеимидной конъюгации, реакционноспособные группы здесь получают посредством восстановления межцепочечных дисульфидов. Однако, в отличие от стохастических методов конъюгации, следующий этап протекает посредством реакции с цистеин-селективными сшивающими реагентами, такие как малеимиды нового поколения [161] и пиридазиндионы [162]. Бис-алкилирующие реагенты позволяют одновременно сохранить

межцепочечные связи между цепями антитела и обеспечить конъюгацию лекарств с высоким DAR.

Ферментативные методы конъюгации используют субстратную специфичность ферментов для сайт-специфичного присоединения лекарств к заданным аминокислотным остаткам или мотивам в составе антитела [163]. Классическим примером служит микробная трансглутаминаза (mTG), катализирующая образование амидной связи между боковой цепью глутамина и линкером, содержащим первичную аминогруппу. Бактериальные трансглутаминазы не способны модифицировать остатки глутамина человеческого IgG1; тем не менее, один глутамин в положении Q295 Fc-фрагмента становится доступным для модификации mTG при условии предварительного удаления/укорачивания гликана консервативного сайта гликозилирования N297, который стерически экранирует Q295. Поскольку тяжелые цепи содержат по одному остатку Q295, реакция обычно приводит к формированию конъюгатов с DAR 2 [164], за исключением случаев, когда используются разветвленные линкеры или искусственно вводятся дополнительные реакционноспособные сайты. Интересно, что ряд подходов, использующих генно-инженерные варианты mTG, позволяют модифицировать Q295 даже без удаления N-связанного гликана антитела [165, 166]. Другая стратегия использует фермент сортазу А, который распознает С-концевую последовательность LPXTG и катализирует ее лигирование с несущим лекарство олигоглициновым мотивом. Введение мотива узнавания сортазы А на С-конец тяжелой или легкой цепи антитела позволяет конъюгировать лекарство по этому сайту [167, 168].

Отдельная группа методов предполагает ферментативную модификацию самого гликана в положении N297, позволяя далее конъюгировать лекарство к антителу по фиксированному сайту тяжелой цепи [169, 170].

Вышеупомянутые ферментативные методы конъюгации, как правило, не ухудшают антиген-связывающие свойства и стабильность антитела, а высокая специфичность ферментов позволяет получать ADC с практически гомогенным DAR. К ограничениям этих методов относятся необходимость включения в структуру антитела коротких пептидных меток (для конъюгации с использованием сортазы А, либо конъюгации по искусственно введенным сайтам узнавания mTG), а также возможные технологические сложности, связанные с неполным удалением ферментов из реакции или недостаточной каталитической активностью ферментов. Кроме того, в зависимости от применяемой методологии, ферментативная модификация/тримминг Fc-гликана может приводить к подавлению Fc-опосредованных эффекторных функций антитела (главным образом, связывание с Fcγ-рецепторами и ADCC); в зависимости от конкретной клинической ситуации данный эффект может рассматриваться как преимущество или недостаток [171].

1.3.4. Лекарства.

Поскольку после внутривенного введения ADC лишь около 2% введенной дозы достигает опухолевых очагов, лекарства, используемые в составе конъюгатов, должны обладать крайне высокой цитотоксической активностью со значениями концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) в низком наномолярном и пикомолярном диапазонах [172, 173]. Подавляющее большинство лекарств, включенных в состав как клинически одобренных ADC, так и тех, что проходят клинические исследования, относятся к трем широким функциональным классам: ингибиторы активности тубулина, ДНК-повреждающие лекарства и ингибиторы активности топоизомеразы I [5, 6]. Эти классы имеют уникальные механизмы действия и профиль токсичности. Интересно отметить, что несмотря на то, что цитотоксическая активность этих лекарств в норме на порядки превышает таковую для традиционной химиотерапии, механизмы действия лекарств в составе всех одобренных на начало 2026 года ADC принципиально не отличаются от механизмов действия используемых в клинике химиотерапевтических препаратов. Ряд лекарств, используемых в составе клинически одобренных ADC, представлен на **рисунке 1.7**.

Тубулин-связывающие лекарства, в первую очередь ауристатинны MMAE и MMAF и майтанзиноиды DM1 и DM4, являются наиболее широко используемыми лекарствами в представленных на рынке ADC. Так, например, анти-CD30 brentuximab vedotin обеспечивает доставку MMAE в клетки лимфом, а анти-HER2 T-DM1 – доставку DM1 в клетки рака молочной железы, и оба ADC демонстрируют значимый клинический успех. Связывая тубулин, лекарства, как правило, блокируют клеточный цикл в фазе G₂/M (митотический арест), что в конечном итоге приводит к апоптозу клетки. Интересно, что тубулин-связывающие лекарства делятся на две категории по механизму действия: стабилизирующие и дестабилизирующие структуру микротрубочек клетки. Так, ауристатинны и производные майтанзина представляют собой дестабилизирующие агенты, напрямую ингибирующие полимеризацию тубулина. В отличие от них, таксаны, такие как паклитаксел, являются стабилизаторами, усиливающими полимеризацию тубулина, и тем самым вызывают нарушение функций веретена деления [174].

Препараты, связывающие тубулин, отличаются быстрым действием и высокой эффективностью в отношении делящихся клеток, что подтверждено в широком спектре солидных и гематологических злокачественных новообразований. Они, как правило, проявляют высокую цитотоксическую активность *in vitro* со значениями IC50, находящимися в низком наномолярном – пикомолярном диапазоне. Одновременно, поскольку их эффекты направлены на микротрубочки клеток, характерной особенностью данного класса препаратов является выраженная зависимость терапевтического эффекта от пролиферативной фракции опухолевых

клеток, что отличает их, например, от повреждающих ДНК препаратов. Основным ограничением этого класса является их токсичность в отношении нормальных пролиферирующих клеток в случае системного высвобождения свободного лекарства из ADC в кровотоки. Поскольку микротрубочки играют важнейшую роль в аксональном транспорте в нейронах, высвобождение лекарства в кровотоки либо захват ADC периферическими нервами может вызывать нейропатию. Так, ADC на основе ММАЕ часто индуцируют периферическую нейропатию, что связывают с поглощением следовых количеств ММАЕ нервными волокнами [175]. Гематологическая токсичность (преимущественно нейтропения) представляет собой еще один класс-специфический эффект этих лекарств, поскольку ингибиторы активности тубулина могут повреждать клетки-предшественники костного мозга при преждевременном высвобождении или в случае экспрессии целевого антигена на клетках крови.

Повреждающие ДНК лекарства, такие как калихеамицины, дуокармицины и димеры пирролобензодиазепина (PBD), индуцируют гибель клеток, связываясь с малой бороздкой ДНК и нарушая структуру ДНК посредством различных механизмов [174]. Эти лекарства отличаются исключительной цитотоксичностью (превосходят другие широко применяемые в ADC лекарства по активности; IC₅₀ в пиколярном диапазоне), поскольку даже единичные необратимые повреждения ДНК, вносимые данными препаратами, способны активировать апоптоз. Например, клинически одобренный анти-CD19 ADC loncastuximab tesirine, несущий димер PBD, эффективен даже против опухолей с низким уровнем экспрессии антигена. В силу высокой цитотоксичности и зачастую необратимого характера повреждений, ДНК-повреждающие лекарства, как правило, проявляют активность в том числе в отношении относительно медленно пролиферирующих опухолевых клеток. Кроме того, для данного класса реже регистрируется развитие резистентности по сравнению с лекарствами, нарушающими функцию микротрубочек.

В то же время ADC, несущие ДНК-повреждающие препараты, характеризуются узким терапевтическим окном и часто более высоким в сравнении с другими широко используемыми классами лекарств риском неспецифических (off-target) побочных эффектов. Повреждение ДНК нормальных клеток возможно при преждевременном высвобождении препарата или в случае, если целевой антиген не является высоко-опухолеспецифичным. Это может приводить к миелосупрессии, гепатотоксичности, офтальмологическим и иным системным побочным эффектам, которые послужили причиной прекращения ряда клинических программ ADC с лекарствами данного класса [176, 177]. Таким образом, несмотря на высокую эффективность ДНК-повреждающих лекарств, неспецифическая генотоксичность часто выступает для них дозопределяющим фактором. Применение данного класса лекарств, как правило, рассматривается в ситуациях, когда эффективность других классов оказывается недостаточной,

а многие разрабатываемые сегодня ADC с такими лекарствами включают перспективные технологические решения, направленные на строгую локализацию их действия опухолевой тканью, такие как линкеры с повышенной стабильностью или опухолеспецифичное «маскирование» связывания с антигеном.

Ингибиторы топоизомеразы I типа, такие как дерукстекан (DXd; производное экзатекана) и SN-38 (активный метаболит иринотекана), относятся к классу лекарств производных и аналогов камптотецина. Механизм действия этих лекарств заключается в стабилизации комплекса топоизомеразы I и ДНК в процессе репликации ДНК, что в конечном счете приводит к гибели клетки. Клинически одобренные ADC, использующие такие лекарства, включают анти-HER2 trastuzumab deruxtecan (лекарство DXd), а также анти-TROP2 sacituzumab govitecan (SN-38) и datopotamab deruxtecan (DXd). Ингибиторы топоизомеразы I часто уступают связывающим тубулин и повреждающим ДНК лекарствам по цитотоксической активности, однако компенсируют этот недостаток способностью высокоэффективно проникать через мембраны опухолевых клеток после высвобождения из ADC и уничтожать соседние антиген-негативные клетки опухоли [178, 179]. Более низкая токсичность этих лекарств подразумевает меньшую системную токсичность в случае их преждевременного высвобождения в кровотоке, однако, как правило, требует использования высокого соотношения лекарства к антителу DAR при создании ADC: так, trastuzumab deruxtecan и sacituzumab govitecan имеют DAR 8.

К недостаткам ADC на основе ингибиторов топоизомеразы I относится ряд специфических побочных эффектов. И trastuzumab deruxtecan, и datopotamab deruxtecan (нацеленные на HER2 и TROP2 соответственно) ассоциируются с развитием интерстициального заболевания легких (ILD), включая значительное количество случаев с летальным исходом [180, 181]. Патогенез ILD во многом неясен, но может быть опосредован высвобождением лекарства в легочной ткани или иммуноопосредованной реакцией [182]. Sacituzumab govitecan нередко вызывает нейтропению и тяжелую диарею (желудочно-кишечная токсичность) – нежелательные явления, также характерные для терапии химиопрепаратом иринотеканом [183]. Клинические данные, полученные при лечении пациентов с раком молочной железы, указывают на то, что селективное давление на опухоль препаратами trastuzumab deruxtecan и datopotamab deruxtecan способствует приобретению топоизомеразой I мутаций, обеспечивающих резистентность опухоли к терапии этими препаратами [184].

Среди применяемых в клинике ADC гематотоксичность, охватывающая нарушения со стороны всех основных линий кроветворения – нейтропению, тромбоцитопению, лейкопению и анемию, является наиболее распространенным тяжелым побочным эффектом [185]. Развитие

гематотоксичности, а также гепатотоксичности и желудочно-кишечных реакций, по всей видимости, обусловлено преждевременным высвобождением лекарств в кровотоки [186]. Подобный профиль токсичности согласуется с характеристиками химиопрепаратов, особенно сильно повреждающих быстро пролиферирующие клетки крови, и подчеркивает актуальность разработки линкеров с повышенной стабильностью в циркуляции, а также использования лекарств, проявляющих избирательную активность по отношению к опухолям даже в случае преждевременного высвобождения в кровотоки.

Большинство лекарств, используемых при разработке ADC, отличаются выраженной гидрофобностью, которая непосредственно влияет на эффективность, фармакокинетический профиль и токсикологические характеристики препарата. Высокая гидрофобность является ключевым (но не единственным; заряд лекарства и структура линкера также очень важны) свойством, обуславливающим способность многих лекарств не только попадать в экспрессирующие мишень клетки в составе ADC в ходе антитело-зависимой интернализации, но и самостоятельно диффундировать в соседние клетки с ограниченной или полностью отсутствующей экспрессией мишени. Данный феномен получил название *bystander* эффект, и имеет принципиальное значение для эффективной элиминации гетерогенных опухолей, в которых сосуществуют антиген-позитивные и антиген-негативные популяции клеток. Аналоги камптотецина DXd и SN-38, ауристин MMAE, димеры пирролобензодиазепинов, и майтанзиноиды DM1 и DM4 [187] способны проявлять *bystander* эффект, а ряд ADC на основе этих лекарств был одобрен для клинического применения в том числе благодаря их способности диффундировать через клеточные мембраны и убивать антиген-негативные опухолевые клетки [188, 178]. Различия в способности ауристинов MMAE / MMAF и майтанзиноидов DM1 / DM4 проявлять *bystander* эффект, а также влияние структуры линкера и сайта конъюгации к антителу на данный феномен подробнее рассмотрены в **главе 3.5** данной работы.

Ранее предполагалось, что наиболее выигрышная стратегия таргетирования опухолей с использованием ADC обязательно включает интернализацию комплекса ADC с мишенью в клетку, с последующим внутриклеточным расщеплением линкера и высвобождением цитотоксического агента. Однако большое количество исследований показывает, что в зависимости от комбинации линкера и лекарства этот механизм не является строго обязательным, а расщепление линкера может происходить внеклеточно [141, 189]. Все больше данных указывает на то, что ряд протеаз – в частности, катепсин В, – первоначально считавшихся медиаторами высвобождения лекарства исключительно в контексте интернализирующихся ADC, также секретируются в микроокружение опухоли [190, 191] и могут обеспечивать высвобождение лекарства из неинтернализирующихся ADC. В подтверждение этого показано, что кондиционированные среды из культур опухолевых клеток содержат катепсины, способные

расщеплять ADC с дипептидным линкером, обеспечивая высвобождение свободного лекарства и дальнейшее уничтожение опухолей [192]. Опухолеассоциированные макрофаги и стромальные фибробласты могут секретировать катепсины B, L и S на высоком уровне [193]. Следует также подчеркнуть, что расщепление дипептидных линкеров не является исключительной функцией катепсинов: например, сериновая гидролаза карбоксилэстераза 1С способна расщеплять валин-цитруллиновый линкер в сыворотке крови грызунов, что приводит к преждевременному высвобождению лекарств из ADC [194]. Расщепление линкера в опухолевом микроокружении может быть также опосредовано кислой средой и/или восстанавливающими условиями. Так, анализ оптимальных комбинаций линкера и лекарства для терапии неходжкинской лимфомы показал, что конъюгация майтанзиноида DM1 с антителами к слабо интернализирующимся антигенам (CD20, CD21, CD72) посредством расщепляемого дисульфидного линкера обеспечивает выраженную противоопухолевую активность в ксенографтных мышинных моделях рака, тогда как применение этого же лекарства в сочетании с нерасщепляемым тиоэфирным линкером не дает сопоставимого эффекта [195]. Таким образом, совокупность данных, полученных как для классических ADC [196, 197], так и для других таргетных форматов – включая конъюгаты фрагментов антител с лекарствами [198, 199], – свидетельствуют о том, что высвобождение лекарства в опухолевое микроокружение может приводить к эффективному уничтожению опухоли.

1.3.5. Иммуностимулирующие эффекты ADC.

Механизмы действия некоторых противоопухолевых препаратов включают возможность активировать иммунную систему и направлять ее против опухоли. Наглядным примером выступают клинически одобренные антитела к контрольным точкам иммунитета PD-1 и CTLA-4 на поверхности иммунных клеток микроокружения опухоли, которые способны индуцировать регрессию некоторых типов опухолей, усиливая уже имеющийся у пациента противоопухолевый иммунный ответ [200]. Конъюгаты антител с лекарствами также в состоянии индуцировать противоопухолевый иммунный ответ посредством различных механизмов.

Клинически одобренные ADC задействуют в борьбе с опухолью иммуноопосредованные механизмы, запускаемые молекулой IgG в составе конъюгата (см. главу 1.2) [201]. Кроме этого, значительная часть лекарств, используемых в современных ADC, способна самостоятельно стимулировать иммунную систему на борьбу с опухолью. Одним из ключевых механизмов, лежащих в основе таких эффектов, является *иммуногенная клеточная гибель* (ICD, immunogenic cell death) опухолевых клеток, которая по определению представляет собой последовательность действий, выполняемых умирающей клеткой, результатом которых в контексте иммунокомпетентного хозяина служит формирование адаптивного

противоопухолевого иммунного ответа [202, 203]. В ходе ICD умирающая клетка высвобождает широкий спектр молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs, damage-associated molecular patterns), в число которых часто включают секрецию во внеклеточное пространство аденозинтрифосфата (АТФ) и белка HMGB1, а также экспрессию на поверхности клетки кальретикулина. Эти сигналы воспринимаются паттерн-распознающими рецепторами (PRRs, pattern recognition receptors) антигенпрезентирующих иммунных клеток, что инициирует воспалительный ответ, способный приводить к активации Т-клеточного адаптивного иммунитета и формированию долгосрочной иммунологической памяти.

Хотя механизмы ICD были исходно описаны в контексте действия ряда химиотерапевтических препаратов (таких как антрациклины, оксалиплатин и таксаны) [204], за последние 10-15 лет значимая роль этих механизмов в противоопухолевой активности ADC была продемонстрирована для представителей почти всех основных классов используемых в конъюгатах лекарств – ингибиторов активности тубулина [205, 206, 207], ДНК-повреждающих лекарств [208, 209] и ингибиторов активности топоизомеразы I [210]. Так, ММАЕ в составе анти-CD30 ADC brentuximab vedotin, применяемого в терапии лимфом, помимо прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки, способствует захвату опухолевых антигенов дендритными клетками, их миграции в лимфатические узлы и праймированию Т-лимфоцитов в мышинной модели рака. В этой же работе наблюдался синергизм при сочетании терапии доластатином 10 – природным соединением, синтетическим аналогом которого является ММАЕ, – с блокадой PD-1/CTLA-4 [211]. Индукция ICD, по всей видимости, является одним из определяющих факторов клинической эффективности комбинации ряда ADC с ингибиторами контрольных точек иммунитета – особенно в опухолях с выраженной иммунной инфильтрацией [5]. Анти-BCMA конъюгат belantamab mafodotin, несущий MMAF, индуцировал активацию дендритных клеток и иммуногенную клеточную гибель в мышинных моделях рака [212], и был одобрен для лечения множественной миеломы отчасти благодаря своей способности запускать ICD [213]. Как используемый для лечения рака молочной железы анти-HER2 ADC trastuzumab deruxtecan [196], так и находящийся в клинических исследованиях анти-HER3 конъюгат patritumab deruxtecan [214] реализуют по крайней мере часть своей противоопухолевой активности в мышинных моделях рака посредством индукции ICD лекарством DXd – ингибитором топоизомеразы I. Также примечательно, что в ряде работ ADC демонстрировали значительно более выраженную активность в мышинных моделях с интактной иммунной системой по сравнению с животными с частично ослабленной иммунной системой, что авторы связывали с иммуномодулирующими противоопухолевыми эффектами лекарств [211, 215, 209].

Отдельную группу лекарств в составе конъюгатов антител представляют сильные иммунологические адъюванты, для которых стимуляция иммунной системы с целью уничтожения опухоли является основной функцией. Два наиболее активно изучаемых в данном контексте класса агентов – **агонисты Toll-подобных рецепторов (TLRs)** и **агонисты стимуляторов генов интерферонов (STING)**, а конъюгаты антител с такими иммуностимулирующими агентами обозначают аббревиатурой ISAC (от англ. immune-stimulating antibody conjugate) [216, 217]. Системное введение агонистов TLR и STING в свободном виде часто сопровождается тяжелыми побочными эффектами вследствие гиперактивации иммунной системы, а их использование в составе конъюгатов с опухолеспецифичными антителами призвано локализовать мощный иммунный стимул этих агентов в пределах микроокружения опухоли. Активируя врожденный иммунитет посредством взаимодействия с PRRs дендритных клеток и макрофагов, ISAC превращают иммунологически «холодные» опухоли в «горячие», тем самым иницируя и/или усиливая уже существующий противоопухолевый иммунный ответ, а также формируя долгосрочную иммунологическую память. Важным механистическим отличием ISAC от классических ADC – по крайней мере применительно к агонистам рецепторов TLR7/8, локализованных в эндосомах миелоидных иммунных клеток, – является то, что фармакологически значимая интернализация конъюгата происходит не в опухолевую, а в иммунную клетку посредством Fcγ-рецептор-опосредованного фагоцитоза; и поэтому медленная или полностью отсутствующая интернализация комплекса антиген-антитело в опухолевую клетку может выступать преимуществом, а не ограничением для данного формата. Значительное количество ISAC на основе агонистов TLR7/8 или STING, направленных против таких мишеней на опухолевых клетках, как HER2 [218, 219], EGFR [220] и PD-L1 [221], показали высокую эффективность в экспериментах на животных, а многие из них уже проходят клинические исследования [216]. Тем не менее применение ряда ISAC в клинике было сопряжено с угрожающими жизни токсическими эффектами, обусловленными гиперактивацией иммунной системы, – в первую очередь с выраженным синдромом высвобождения цитокинов, а также с высоким уровнем образования анти-лекарственных антител (ADA), что повлекло за собой досрочное прекращение немалого количества клинических программ [222].

1.3.6. Новые форматы ADC и комбинаторные стратегии терапии.

Использование конъюгатов антител с лекарствами сопряжено с типичными для терапии рака препятствиями, такими как сложность таргетирования опухолей с гетерогенной экспрессией мишени, лекарственная резистентность и токсичность препаратов по отношению к здоровым тканям. Ряд новых форматов ADC [223, 5, 224], среди которых можно выделить биспецифичные

ADC, конъюгаты на основе условно активируемых в опухоли антител, конъюгаты антител с индукторами таргетной деградации белков [225, 226], а также ADC, одновременно несущие несколько типов лекарств, предлагают уникальные стратегии для преодоления вышеупомянутых проблем. Некоторые примеры перспективных форматов представлены на **рисунке 1.8**.

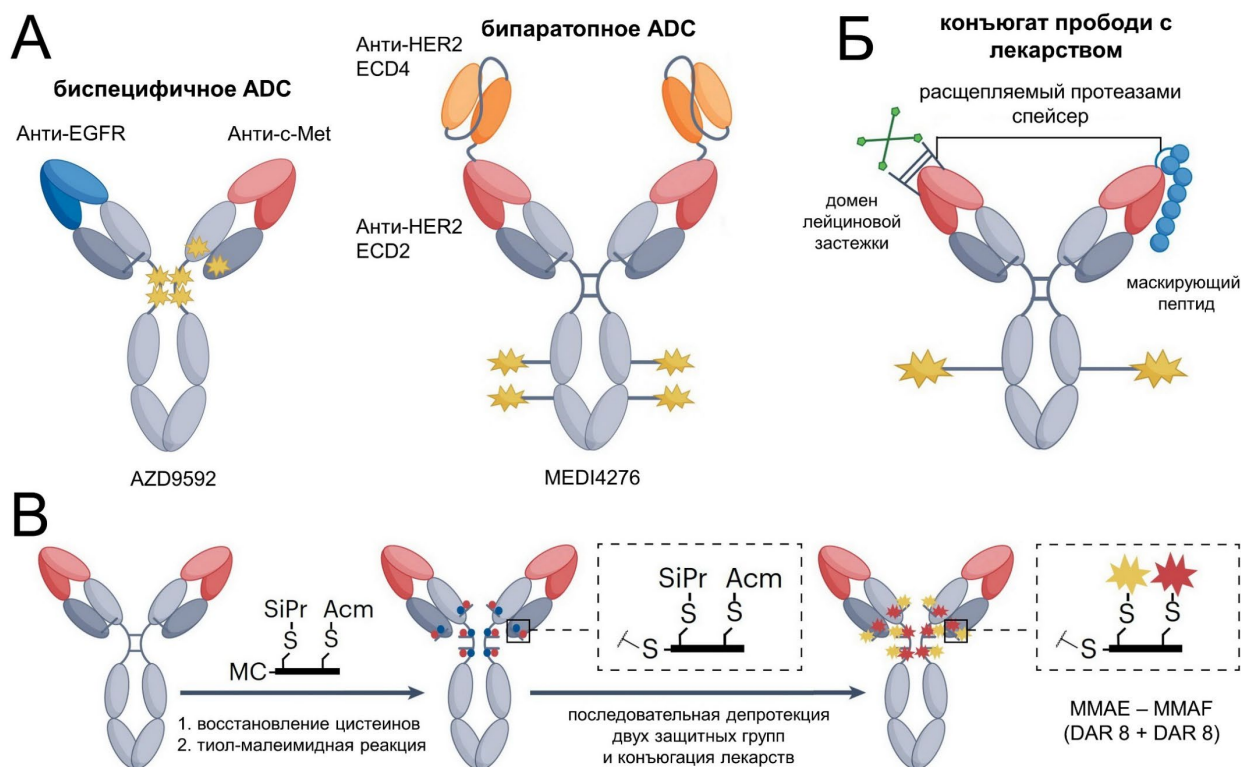


Рисунок 1.8. Перспективные форматы конъюгатов антител с лекарствами. *А.* Биспецифичные ADC AZD9592 и MEDI4276, достигшие стадии клинических исследований. *Б.* Конъюгаты протоди с лекарствами, использующие в качестве маскирующей группы домен лейциновой застежки либо маскирующий пептид (CX-2051, в клинических исследованиях). *В.* ADC с двумя типами лекарств MMAE и MMAF, полученный посредством конъюгации лекарств по ортогональным химическим группам линкера [227]. Рисунок на основе [223].

Биспецифичные антитела позволяют связать два различных антигена на поверхности одной или двух клеток [228, 229]. При правильном выборе мишеней на опухолевых клетках биспецифичные ADC способны обеспечить более селективное связывание с опухолью, тем самым снижая риск токсичности в отношении здоровых тканей. Исследуемые **биспецифичные ADC** можно разделить на два типа: молекулы, направленные против различных эпитопов одного и того же антигена, известные также как бипаратопные ADC; и молекулы, направленные против двух различных антигенов.

HER2 является важной мишенью бипаратопных ADC. Антитело, связывающее два различных эпитопа HER2 вместо одного эпитопа способно индуцировать образование более

крупных кластеров рецепторов на поверхности клетки. Это приводит к более эффективной даунрегуляции рецептора и доставке лекарства в клетку, в особенности для популяций опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии HER2. Как минимум два анти-HER2 бипаратопных ADC достигли стадии клинических исследований. MEDI4276 обеспечивает тетравалентное связывание с двумя различными эпитопами (внеклеточный домен 2 (ECD2) и внеклеточный домен 4 (ECD4)) на двух молекулах HER2 [230, 231], в то время как ZW49 способен к бивалентному связыванию с ECD2 и ECD4 на одной молекуле HER2 [232]. Примером таргетирования двух различных антигенов, дошедшим до клинических исследований, является биспецифичный анти-EGFR/c-Met ADC AZD9592 [233]. В то же время, формат биспецифичных антител / ADC несет потенциальные риски. Так, в некоторых случаях высок риск непреднамеренной активации рецепторов при проявлении агонистической активности, что наблюдалось в случае отдельных биспецифичных антител, направленных против EGFR и c-Met [234]. Кроме того, уровни экспрессии двух целевых антигенов могут варьировать как между различными опухолями, так и между пациентами, что осложняет отбор подходящих пациентов.

Для борьбы с неспецифической токсичностью в здоровых тканях, экспрессирующих мишень (on-target off-tumor), нередко вынуждающей снижать дозы ADC или прекращать лечение, был разработан ряд форматов на основе **условно активируемых антител** или **прободи** (не все условно активируемые в опухоли антитела называют прободи, однако для простоты мы будем называть так все упомянутые ниже форматы) [235, 236]. Прободи остаются инертными до тех пор, пока не попадают в микроокружение опухоли. Как правило, они представляют собой молекулы IgG либо снабженные пептидами, маскирующими антиген-связывающие CDR-участки антител, либо сконструированные таким образом, что CDR-участки претерпевают рН-зависимые конформационные изменения, снижающие аффинность к мишени. Достигая микроокружения опухоли, прободи утрачивают маскирующие пептиды либо изменяют конформацию антиген-связывающих сайтов под действием ряда опухолеассоциированных факторов [223].

Первая широкая группа подходов по созданию конъюгатов прободи с лекарствами основана использовании пептидов, маскирующих антиген-связывающие свойства антитела и соединенных с антителом чувствительным к действию протеаз спейсером. В зависимости от применяемого подхода, такие пептиды либо непосредственно связываются с CDR-участками антитела, либо стерически блокируют их в кровотоке и нормальных тканях, но при этом удаляются в богатом протеазами опухолевом микроокружении, восстанавливая тем самым связывание с антигеном. Идентифицирован ряд пептидных спейсерных последовательностей, избирательно чувствительных к протеазам, активность которых минимальна в здоровых тканях, но значительно повышена в микроокружении различных опухолей; к ним относятся отдельные

матриксные металлопротеиназы, урокиназный активатор плазминогена [237], трансмембранная сериновая протеаза I типа [238], и легумаин [239]. Оригинальный формат Probody[®], разработанный компанией CytomX Therapeutics, предусматривает присоединение маскирующего пептида к N-концу легкой цепи антитела через расщепляемый протеазой спейсер: пептид физически связывает CDR и блокирует их вплоть до достижения молекулой опухоли [235, 240]. Одним из клинически значимых примеров от CytomX Therapeutics, в настоящее время проходящим клинические исследования в пациентах с колоректальным раком, является анти-EpCAM конъюгат CX-2051 с лекарством класса ингибиторов топоизомеразы I. EpCAM представляет собой валидированную в онкологии мишень, однако разработка направленных на этот маркер препаратов осложнена его широкой экспрессией в нормальных тканях. CX-2051 может позволить открыть терапевтическое окно для системно вводимых анти-EpCAM конъюгатов антител с лекарствами. Альтернативный подход, не зависящий от конкретных последовательностей CDR антитела, и потому не требующий разработки индивидуального маскирующего пептида для каждого антитела, использует в качестве маскирующей группы гетеродимерный спирально-спиральный домен лейциновой застёжки (bZIP) человека [241]. Эта жесткая пептидная структура была слита с N-концами как легкой, так и тяжелой цепи антитела посредством расщепляемых матриксными металлопротеиназами 2 и 9 пептидных спейсеров, обеспечивая тем самым стерическое подавление взаимодействия антитела с мишенью. Авторы продемонстрировали применимость данной технологии для опухолеспецифичной активации конъюгатов, направленных против CD19, CD20, HER2 и интегрин $\alpha V\beta 6$, в мышинных моделях рака.

Вторая группа конъюгатов прободит с лекарствами использует антитела с pH-чувствительными антиген-связывающими сайтами. Слабокислая среда опухолевого микроокружения (pH в интервале 6-7 против pH 7.4 в нормальных тканях и крови) индуцирует конформационные изменения, позволяющие антителу связать антиген. Один из наиболее успешных подходов использует физиологически присутствующие в опухоли молекулы, таких как хлорид, бикарбонат и сульфид, в качестве белок-ассоциированных химических переключателей функциональной активности модифицированного антитела (технология PaCS, protein-associated chemical switches, от компании BioAtla) [242]. На основе этой платформы разработан ряд препаратов, в частности, AXL- и ROR2-специфичные конъюгаты прободит с лекарствами, которые в настоящее время проходят клинические исследования.

Большинство солидных опухолей характеризуется выраженной внутриопухолевой гетерогенностью, при которой субпопуляции клеток демонстрируют различную чувствительность к лекарствам с разными механизмами действия. В связи с этим монотерапия

часто создает селективное давление, способствующее клональной экспансии резистентных клеточных популяций, и в конечном итоге приводит к рецидиву заболевания. Новые подходы в области химии конъюгации открывают возможность одновременно оснащать ADC двумя различными лекарствами с заданной степенью пришивки DAR. **ADC, несущие два типа лекарств**, могут позволить преодолеть резистентность опухолей к терапии классическими ADC, сохраняя при этом удобный режим дозирования в рамках монотерапии [227, 243]. Вместе с тем важно учитывать, что использование таких конъюгатов может сопровождаться аддитивной или даже синергичной токсичностью.

В рамках одного из подходов [227] к получению ADC с двумя типами лекарств (см. **рисунок 1.8, В**), исследователи из компании Seattle Genetics (сегодня в составе Pfizer) – создателя нескольких первых клинически одобренных ADC на основе ауристатинов – конъюгировали по 8 молекул каждого из лекарств MMAE и MMAF к CD30-специфичному антителу. MMAE, являясь субстратом ряда транспортеров множественной лекарственной резистентности (MDR), как правило, обладает сниженной активностью в отношении MDR⁺ опухолевых клеток, однако высокая гидрофобность позволяет ему эффективно диффундировать через мембраны клеток и уничтожать соседние клетки посредством *bystander* эффекта. MMAF, будучи заряженной молекулой, устойчив к экспорту MDR-транспортерами и высокоактивен в отношении MDR⁺ клеток, однако вследствие ограниченной клеточной проницаемости не в состоянии убивать соседние клетки [188]. Полученный ADC с двумя типами лекарств показал высокую активность как в ксенографтной мышинной модели CD30-положительной MDR⁺ анапластической крупноклеточной лимфомы, так и в ксенографтной модели MDR⁻ лимфомы Ходжкина с гетерогенной экспрессией CD30; в то же время, каждый из конъюгатов с одним типом лекарства (MMAE либо MMAF) был эффективен лишь в одной из двух моделей рака. Также примечательно, что конструкция линкера, обеспечивающая ортогональную конъюгацию лекарств, включает два технологических решения, направленных на улучшение фармакокинетики ADC: самостабилизирующийся малеимид (mDPR), минимизирующий деконъюгацию в крови [244], а также гидрофильный спейсер на основе PEG₂₄, предотвращающий агрегацию конъюгата с высокой степенью пришивки гидрофобного лекарства [245].

В другой работе с использованием сайт-специфичной конъюгации по Fc-фрагменту HER2-специфичного антитела посредством микробной трансглутаминазы, были также получены ADC, одновременно несущие MMAE и MMAF, которые демонстрировали более высокую противоопухолевую эффективность в сравнении с совместным введением двух ADC, несущих каждое из лекарств по отдельности, в мышинных моделях рака молочной железы с гетерогенной экспрессией HER2 [243]. Кроме этого, имеются успешные примеры использования ADC с двумя

лекарствами принципиально разных механизмов действия. Так, конъюгат анти-FolR α антитела с ингибитором полимеризации тубулина гемиастерлином и агонистом TLR, полученный компанией Sutro Biopharma, демонстрировал более высокую противоопухолевую активность и более эффективное формирование иммунологической памяти в мышинных моделях рака в сравнении с применением данных лекарств в составе отдельных ADC [246].

Поскольку различные типы опухолей характеризуются разной чувствительностью к тому или иному классу цитотоксических агентов, диверсификация спектра используемых в составе ADC лекарств имеет крайне важное значение. Широкий спектр лекарств, включая классы с механизмами действия, отличающимися от тех, что были рассмотрены выше, проходят клинические испытания в составе ADC [179, 5]. Показательным примером принципиально нового класса лекарств, находящихся на стадии клинических испытаний в составе ADC, служат производные α -аманитина – высокотоксичного ингибитора РНК-полимеразы II, выделенного из ядовитых грибов *Amanita phalloides* (Бледной поганки), – которые в состоянии индуцировать апоптоз как в активно пролиферирующих, так и в покоящихся опухолевых клетках [247].

Один из базовых принципов терапии рака гласит, что применение комбинации препаратов с различными механизмами действия повышает вероятность достижения полной ремиссии у пациентов, особенно в условиях гетерогенности опухоли [248]. Ключевые направления комбинаторной терапии с использованием ADC включают, в числе прочих, их сочетание с ингибиторами контрольных точек иммунитета (например, блокада оси PD-1/PD-L1 [249]), с антиангиогенными препаратами (прежде всего, анти-VEGF α мАт bevacizumab [250]), а также с классической химиотерапией [251, 252]. Комбинаторные режимы на основе ADC и химиотерапии, как правило, предполагают включение агентов с различными механизмами действия с целью достижения аддитивного/синергичного противоопухолевого эффекта и минимизации аддитивной токсичности. Наиболее клинически зрелым примером здесь вероятно выступает использование ADC в качестве таргетной замены одного из высокотоксичных компонентов стандартных режимов химиотерапии. Наряду с этим, ADC нередко комбинируют с химиотерапевтическим партнером, подобранным с учетом профиля резистентности лекарства в составе конъюгата. Время введения препаратов представляет собой еще один важный параметр при разработке комбинаторных стратегий: одновременное введение ADC и химиотерапии не всегда является выигрышной стратегией, поскольку конъюгату антитела с лекарством может потребоваться дополнительное время для интернализации в опухолевые клетки и реализации цитотоксической активности [253].

1.4. Фрагменты антител как альтернатива полноразмерным антителам в терапии рака: фокус на конъюгаты с лекарствами.

1.4.1. Основные форматы.

Имуноглобулин G является довольно крупной молекулой, и его размер часто затрудняет проникновение вглубь солидных опухолей, приводя к преимущественной локализации на их периферии. Следствием этого является снижение терапевтической эффективности как самих молекул антител, так и их конъюгатов с различными эффекторными молекулами. Гены доменов антитела, а, главное, переменных доменов легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепей можно комбинировать различными способами и получать фрагменты антител меньшей молекулярной массы, сохраняющие специфичность родительского антитела.

Среди форматов фрагментов антител, широко изучаемых для терапии, можно выделить природный антиген-связывающий Fab-фрагмент полноразмерного антитела, а также получаемые генно-инженерным путем scFv-фрагмент, диабоды, минибоды, и различные форматы однодоменных антител. Некоторые распространенные форматы фрагментов антител изображены на рисунке 1.9.

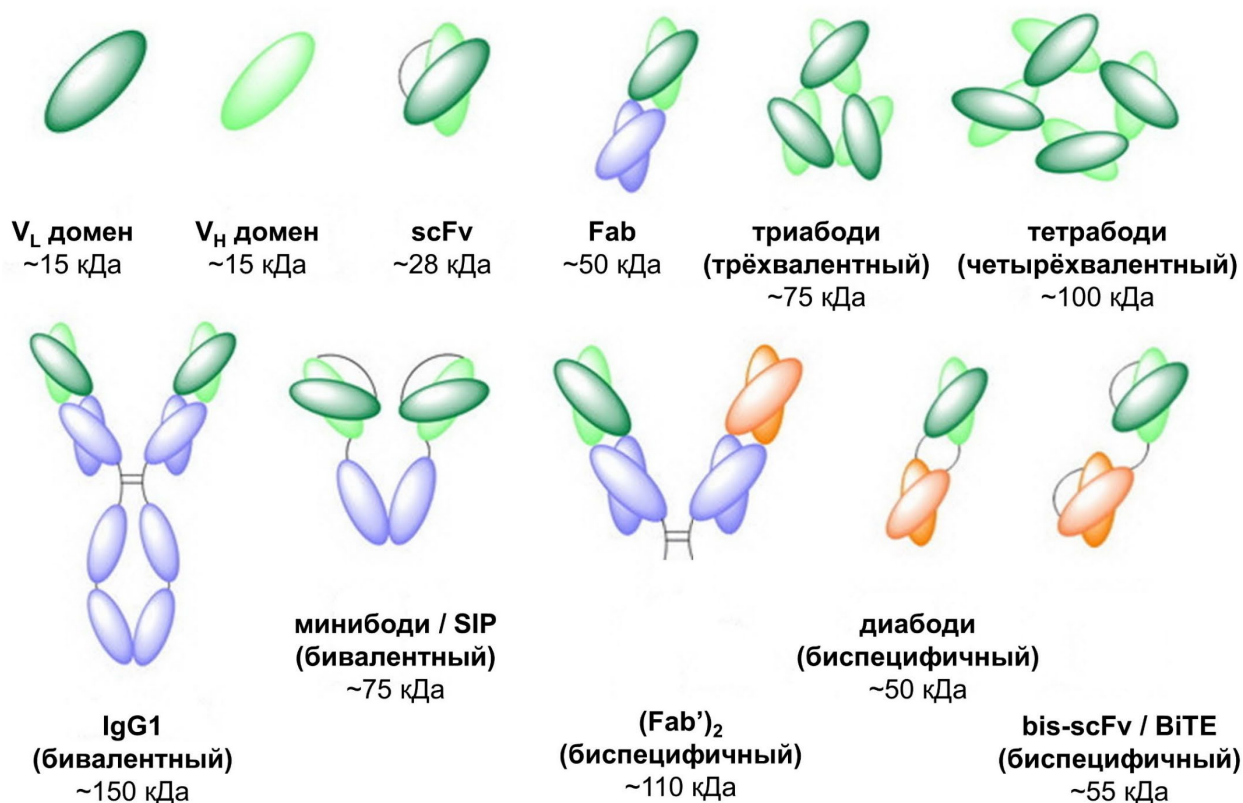


Рисунок 1.9. Примеры форматов фрагментов антител. $(Fab')_2$, диабоды и bis-scFv представлены в их биспецифичных вариантах. На основе [254].

ScFv-фрагмент представляет собой фьюжн-белок переменных доменов антитела V_L и V_H , соединенных гибким пептидным линкером. Сокращение длины линкера scFv-фрагмента до 3-12 аминокислот приводит к его нековалентной димеризации с образованием бивалентного диабоди, а полное удаление линкера – к ассоциации нескольких scFv в триабоди либо тетрабоди [255, 256]. Минибоди является гомодимером scFv-фрагмента и константного домена C_{H3} человеческого IgG1, связанных друг с другом шарнирной областью IgG1. Помимо нековалентного взаимодействия константных доменов, гомодимер дополнительно стабилизирован двумя межцепочечными дисульфидными связями, образующимися в шарнирной области [257]. Похожий на минибоди по структуре формат SIP (small immune protein) включает вместо домена $\gamma 1C_{H3}$ домен ϵC_{H4} человеческого IgE. У SIP отсутствует шарнирная область – scFv фрагмент и константный домен связаны коротким пептидом, не включающим цистеины; однако по одному цистеину введено на C-конец каждой из двух цепей специально для конъюгации лекарств [258, 259]. Биспецифичные фрагменты антител связывают два разных антигена посредством двух отдельных антиген-связывающих участков, часто выступая в качестве линкера между опухолевой и иммунной клетками (например, формат BiTE).

Однодоменные антитела (sdAb) [260] состоят из одного переменного домена массой всего 11–15 кДа. Наиболее известные sdAb получены из антител, состоящих только из тяжелых цепей (HCAb), обнаруженных у семейства верблюдовых (ламы и альпаки). Их называют VHH-фрагментами или нанободи [261]. VHH характеризуются более длинной антиген-связывающей петлей CDR3 в сравнении с таковой у антител человека, часто формирующей выпуклую структуру, которая повышает их способность связываться с труднодоступными мишенями. Акулы также продуцируют одноцепочечные антитела (IgNAR), а их переменные домены, известные как VNAR, характеризуются крайне высокой стабильностью. VNAR эволюционно отличаются от VHH, обладая другой структурой петель (часто отсутствует эквивалент CDR2). Создание стабильных, полностью человеческих sdAb является более сложной задачей, поскольку человеческие V_H и V_L домены эволюционно приспособлены к работе в паре – однако несет преимущество в виде сниженной иммуногенности в человеческом организме. Отдельные человеческие V_H и V_L домены, как правило, нестабильны и агрегируют в растворе из-за наличия гидрофобного интерфейса между V_H и V_L в составе молекулы IgG. Для преодоления этого препятствия стабильные человеческие sdAb создаются синтетически – ключевые гидрофобные остатки интерфейса мутируют в гидрофильные. Затем эти стабилизированные структуры используют для создания больших дисплейных библиотек с рандомизированными CDR-участками, которые могут быть использованы для отбора высокоаффинных молекул [262, 263].

Однодоменные антитела не являются наиболее компактными антиген-связывающими конструкциями белковой/пептидной природы. В терапии и диагностике все шире применяются

миметики антител неиммуноглобулинового происхождения. Примерами подобных форматов являются дарпины (DARPin, 10–18 кДа) – скаффолды на основе анкириновых повторов [264, 265, 266], аффибоды (affibodies, ~6 кДа), сконструированные на базе трехспирального Z-домена стафилококкового белка А [267], а также бициклические пептиды (bicyclic peptides, ~2 кДа), имитирующие структуру петель CDR антител, но сохраняющие при этом фармакокинетические свойства низкомолекулярных соединений [268, 269]. Эти и другие миметики антител, а также их конъюгаты с лекарствами проходят клинические исследования в терапии рака [270, 271]. Антиген-связывающие белки неиммуноглобулинового происхождения не рассматриваются в данном обзоре.

1.4.2. Преимущества и недостатки в терапии рака.

Различные форматы фрагментов антител *проникают в опухоль быстрее и распределяются по ней более равномерно* по сравнению с антителами после системного введения [272, 273, 8]. Улучшенное проникновение в опухоль часто объясняется их меньшим молекулярным радиусом, который обеспечивает более быструю экстравазацию из сосудов и диффузию через плотную строму опухоли [274, 275]. Компактная структура также часто позволяет фрагментам антител взаимодействовать с криптотопами на поверхности антигенов (например, с активными сайтами ферментов), которые недоступны для молекул IgG.

Кроме этого, полноразмерные антитела часто захватываются несколькими первыми слоями антиген-экспрессирующих клеток опухоли, непосредственно контактирующими с кровеносными сосудами, – феномен, называемый *барьером связывающих сайтов*. Это приводит к гетерогенному распределению препарата – периваскулярные области получают высокую дозу, в то время как более отдаленные опухолевые клетки не получают препарат, создавая условия для рецидива и развития лекарственной устойчивости [276]. В одном из первых исследований, подтвердивших этот феномен [277], в модель карциномы морской свинки совместно вводили высокоаффинное антиген-связывающее антитело (D3) и несвязывающийся изотипический контроль. При низких концентрациях антитело D3 было ограничено периваскулярным пространством и плохо проникало в ткань, в то время как несвязывающееся антитело распределялось по опухоли. Это показало, что ткань была физически проницаема для антител, а барьер являлся прямым следствием высокоаффинного связывания антитела D3. Барьер удалось преодолеть, а проникновение улучшить, только при введении высоких доз антитела D3, достаточных для насыщения периферических сайтов связывания.

Предложен ряд подходов для преодоления барьера связывающих сайтов. Один из них – совместное введение ADC и неконъюгированного антитела с идентичной специфичностью. Так, было показано, что совместное введение фиксированной дозы анти-HER2 ADC T-DM1 и

антитела trastuzumab значительно улучшает выживаемость в мышинной модели рака по сравнению с применением одного лишь ADC [278]. Это происходило вопреки отсутствию активности trastuzumab в качестве монотерапии в данной модели. Антитело конкурировало за рецепторы периваскулярных клеток и насыщало их, способствуя проникновению ADC вглубь опухоли. Тем не менее, эффективность вышеупомянутого подхода не универсальна, что, наблюдали в комбинированной терапии HER2-положительных опухолей как в животных моделях [279], так и в клинических исследованиях [280]. Еще одной очевидной стратегией, позволяющей преодолевать барьер связывающих сайтов, является использование в конъюгатах с антителами лекарств, проявляющих *bystander* эффект. Наконец, переход от полноразмерных антител к фрагментам антител, обычно обладающих более низкой аффинностью к антигену (а также часто – моновалентным связыванием с антигеном в противовес бивалентному связыванию для IgG), может обеспечить более эффективную диффузию молекул в опухоль благодаря их возможности претерпевать несколько этапов ассоциации-диссоциации с антигеном на клетках опухоли перед рецептор-опосредованной интернализацией [281].

Обратной стороной улучшенного проникновения фрагментов антител в опухоль в сравнении с полноразмерными антителами является их более короткое время циркуляции в кровотоке. Это обусловлено быстрым почечным клиренсом для фрагментов размером ниже порога клубочковой фильтрации (~60-70 кДа) [282] и отсутствием у большинства фрагментов антител Fc-фрагмента. Фрагменты антител, лишенные Fc-фрагмента, утрачивают механизм рециркуляции, опосредованный неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который обеспечивает длительное время циркуляции IgG в кровотоке. Так, у грызунов терминальный период полужизни ($T_{1/2\beta}$) scFv-фрагментов обычно составляет порядка 0.5-2 часов. Бивалентные фрагменты большей молекулярной массы циркулируют дольше: $T_{1/2\beta}$ для диабоды обычно составляет 3-7 часов, а для минибоды – 5-11 часов. Для сравнения, $T_{1/2\beta}$ для IgG у грызунов составляет ~1-2 дня, в зависимости от подкласса [283].

Быстрый клиренс фрагментов антител представляет собой «палку о двух концах»: он сокращает время воздействия фрагментов на опухоль, зачастую приводя к их более низкому суммарному накоплению в опухоли в сравнении с IgG на длительных интервалах времени [284, 285], но одновременно снижает системную токсичность фрагментов, минимизируя их накопление в здоровых тканях. В различных ксенографтных мышинных моделях показано, что фрагменты антител (scFv, диабоды, минибоды, Fab-фрагменты и другие) демонстрируют более высокие соотношения «опухоль/кровь» и «опухоль/органы» по сравнению с полноразмерными антителами на коротких интервалах времени [286, 287, 288]. Ускоренная системная элиминация позволяет вводить фрагменты антител (и их конъюгаты с различными эффекторными молекулами) чаще либо в более высоких дозах в сравнении с IgG. Например, классические ADC

обычно вводят пациентам раз в 2-3 недели в том числе с целью избежать кумулятивной токсичности [289]. Возможность *эскалации дозы* для доставки большего количества цитотоксического препарата в опухоль в сравнении с полноразмерным форматом без формирования непереносимых побочных эффектов показана для различных конъюгатов фрагментов антител с лекарствами в животных моделях рака [290, 291].

Рисунок 1.10 наглядно демонстрирует ряд преимуществ и недостатков фрагментов антител с сравнении с полноразмерными антителами. В представленной работе [273] мышам внутривенно вводили флуоресцентно-меченные HER2-специфичные фрагменты антител (мономер или димер нанободи) либо полноразмерное антитело trastuzumab, и сравнивали их проникновение вглубь HER2-положительной опухоли SKOV-3 с хорошо сформированной сосудистой системой. Как видно на фотографиях, сделанных через уже через несколько минут после введения, мономер нанободи равномерно окрашивал ткань опухоли, в то время как полноразмерное антитело прокрашивало только кровеносные сосуды. Однако, через 24 ч сигнал мономера нанободи практически отсутствовал, а накопление полноразмерного антитела в опухоли, напротив, было максимально (хоть и здесь для IgG наблюдалось неоднородное распределение). Димер нанободи характеризовался промежуточными свойствами.

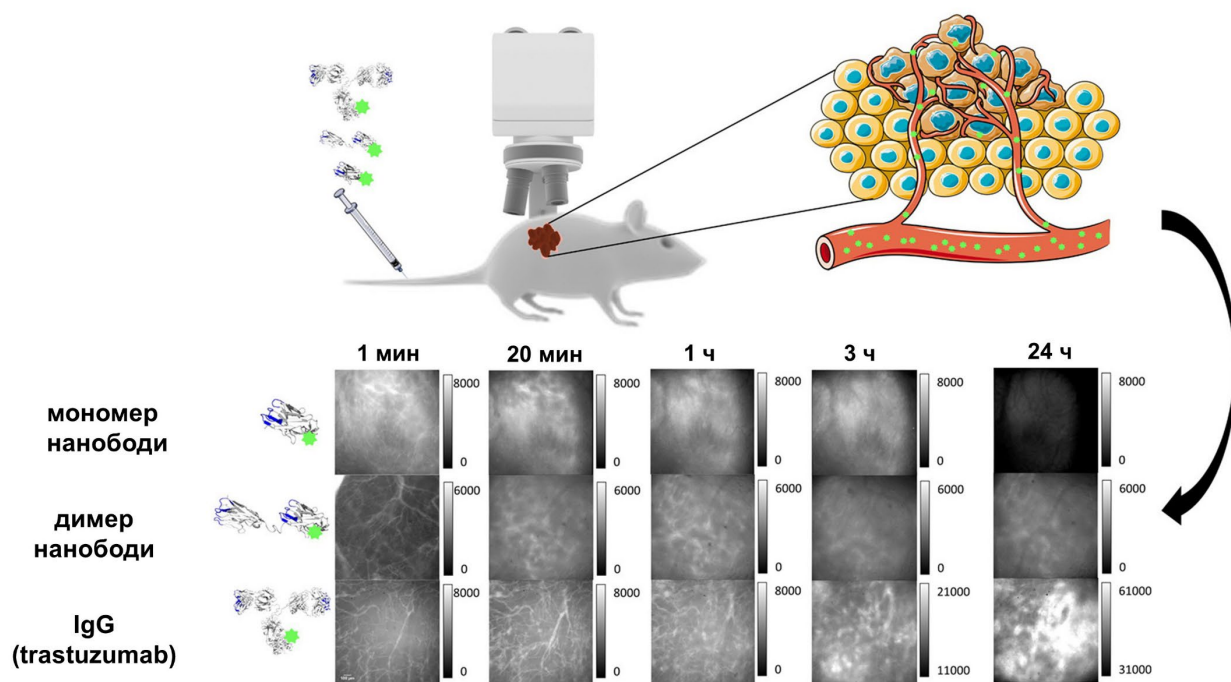


Рисунок 1.10. Прижизненная флуоресцентная микроскопия HER2-положительных опухолей рака яичников SKOV-3 после внутривенного введения мышам флуоресцентно-меченных анти-HER2 нанободи либо полноразмерного антитела. На основе [273].

Отдельным преимуществом многих фрагментов антител, в особенности тех, у которых отсутствует Fc-фрагмент, по сравнению с IgG является возможность производить их в

бактериальных либо дрожжевых системах экспрессии, что значительно упрощает процесс и снижает стоимость производства [292]. Молекулы IgG содержат сайт N-гликозилирования в Fc-фрагменте, который важен для стабильности и проявления эффекторных функций. Аберрантное гликозилирование может также обладать высокой иммуногенностью. Поэтому для получения посттрансляционных модификаций IgG, приближенных к тем, которые происходят в естественных условиях, часто необходимо использовать системы экспрессии клеток млекопитающих, такие как клетки яичников китайского хомячка (СНО) или клетки почки эмбриона человека (НЕК).

Отсутствие Fc-фрагмента у многих фрагментов антител также означает, что они теряют способность к активации Fc-опосредованных иммунных эффекторных механизмов ADCC, ADCP и СМС, что несет как недостатки, так и преимущества в терапии. Данные механизмы часто приводят к формированию тяжелых побочных эффектов у пациентов, например инфузионных реакций, связанных с активацией системы комплемента.

1.4.3. Фрагменты антител в клинической практике.

Ряд фрагментов моноклональных антител успешно преодолел клинические испытания и используется в терапии рака, сердечно-сосудистых, иммунологических, офтальмологических и других заболеваний. Некоторые из них представлены в **таблице 1.1**. Для терапии также одобрены фрагменты поликлональных антител, значительная часть которых представляет собой антитоксины при укусах змей и скорпионов, либо антидоты при передозировке лекарствами [8].

Fab-фрагмент abciximab стал первым терапевтическим фрагментом моноклонального антитела, одобренным FDA в 1994 и ЕМА в 1995 году. Он ингибирует связывание поверхностного рецептора тромбоцитов GPIIb/IIIa с фибриногеном и другими адгезионными молекулами, тем самым препятствуя тромбообразованию у пациентов с коронарной недостаточностью.

Еще одним препаратом на рынке является пегилированный анти-TNF α Fab'-фрагмент certolizumab pegol, который одобрен для лечения болезни Крона и ревматоидного артрита. К свободному концевому цистеину Fab' посредством малеимидного линкера был пришит полиэтиленгликоль массой 40 кДа (Y-подобной формы). Certolizumab pegol связывает как растворимый, так и трансмембранный TNF α , ингибируя сигнализацию рецептора и нейтрализуя роль TNF α в качестве ключевого медиатора при воспалении [293].

Наглядными примерами фрагментов антител в клинической практике служат анти-VEGF-А препараты, которые используются в качестве лечения влажной макулодистрофии и нескольких других заболеваний глаза. Ranibizumab и brolucizumab представляют собой Fab-фрагмент и scFv-фрагмент соответственно, одобренные для применения в виде внутриглазных инъекций. Оба

получают в бактериальных клетках *E. coli*. Оба связывают эндотелиальный фактор роста VEGF-A и предотвращают его взаимодействие с рецепторами VEGFR1 и VEGFR2 на поверхности эндотелиальных клеток глаза, подавляя образование новых сосудов. Ranibizumab получен в ходе аффинного созревания и модификации полноразмерного mAb bevacizumab, широко используемого в онкологии, при этом интравитреальное применение самого bevacizumab также распространено офф-лейбл. Уменьшение молекулярной массы в ряду полноразмерный IgG – Fab-фрагмент – scFv-фрагмент определяет фармакокинетические характеристики этих препаратов – в частности, период их полужизни в стекловидном теле, – что, в свою очередь, обуславливает различия в их режимах дозирования [294].

Таблица 1.1. Примеры одобренных для терапии фрагментов моноклональных антител. Включены препараты, одобренные в США (FDA) и России (РЗН). Не рассмотрены одобренные для терапии фрагменты поликлональных антител. На основе [8, 295].

МНН / брендовое название	Описание	Целевой антиген	Основная нозология	Впервые одобрен для применения
Abciximab / ReoPro	Химерный Fab	GPIIb/IIIa	Коронарная сердечная недостаточность	1994 FDA
Ranibizumab / Lucentis	Гуманизированный Fab	VEGF-A	Макулярная дегенерация	2006 FDA 2008 РЗН [296]
Certolizumab pegol / Cimzia	Пегилированный гуманизированный Fab'	TNF- α	Ревматоидный артрит	2008 FDA 2010 РЗН
Blinatumomab / Blincyto	Мышиный биспецифичный тандемный scFv (BiTE)	CD19 и CD3	Острая лимфобластная лейкемия	2014 FDA 2016 РЗН
Idarucizumab / Praxbind	Гуманизированный Fab	Дабигатрана этексилат	Нейтрализация антикоагулянт- ного эффекта дабигатрана	2015 FDA 2023 РЗН
Caplacizumab / Cabliivi	Фьюжн-белок двух нанободи (VNH)	VFW (фактор фон Виллебранда)	Тромбоцито- пеническая пурпура	2019 FDA
Brolucizumab / Beovu	Гуманизированный scFv	VEGF-A	Макулярная дегенерация	2019 FDA 2020 РЗН
Efgartigimod alfa / Vyvgart	Человеческий модифицированный Fc-фрагмент	FcRn (неона- тальный Fc рецептор)	Миастения	2021 FDA
Envafolimab / Enweida	Фьюжн-белок двух нанободи (VNH) и Fc-фрагмента	PD-L1	Рак желчных протоков	2021 FDA (статус орфанного препарата)
Tarlatamab / Imdelltra	Фьюжн-белок биспецифичного тандемного scFv и Fc- фрагмента (BiTE)	DLL3 и CD3	Мелкоклет- точный рак легкого	2025 FDA

Пожалуй, наиболее значимыми на сегодняшний день фрагментами антител в клинической практике онкологических заболеваний являются биспецифичные активаторы Т-клеток (BiTE, bispecific T-cell engagers). Два одобренных для терапии препарата, blinatumomab и tarlatamab, созданы на базе технологической платформы BiTE[®] компании Amgen, которая разработана для привлечения собственных Т-клеток пациента к уничтожению опухолей [130]. Blinatumomab представляет собой биспецифичный анти-CD19/CD3 препарат, состоящий из двух мышинных scFv-фрагментов, соединённых гибким пептидным линкером. Он был одобрен FDA для лечения Ph-негативного пре-В-клеточного острого лимфобластного лейкоза у взрослых и детей в 2014 году [297], а впоследствии зарегистрирован и в России. Механизм его действия основан на физическом связывании инвариантного компонента CD3 Т-клеточного рецептора с молекулой CD19 на поверхности как нормальных, так и опухолевых В-клеток. Это взаимодействие индуцирует пролиферацию Т-клеток, выработку цитолитических белков и высвобождение провоспалительных цитокинов, что в совокупности приводит к лизису CD19-позитивных клеток. Tarlatamab – биспецифичный анти-DLL3/CD3 активатор Т-клеток, одобренный для лечения мелкоклеточного рака легкого в 2025 году [298]. Препарат одновременно связывает DLL3 на поверхности опухолевых клеток и ко-рецептор CD3 на Т-клетках, вызывая активацию последних и лизис DLL3-экспрессирующих клеток. Примечательно, что tarlatamab стал первым препаратом из широкого класса активаторов Т-клеток (TCE, T-cell engagers), одобренным для лечения солидного рака.

Фармакокинетические характеристики blinatumomab и tarlatamab сильно отличаются друг от друга. Вследствие относительно небольшой молекулярной массы (55 кДа) и отсутствия Fc-фрагмента (и FcRn-зависимой рециркуляции) blinatumomab быстро выводится почками и имеет период полужизни $T_{1/2\beta}$ у человека ~ 2 ч. Это обуславливает необходимость его введения пациентам с помощью инфузионного насоса каждый день на протяжении 4 недель в рамках стандартного 6-недельного курса терапии [299]. Tarlatamab (105 кДа) представляет собой фьюжн-белок биспецифичного тандемного scFv и Fc-фрагмента антитела, и поэтому характеризуется увеличенным терминальным периодом полужизни, составляющим 11 дней. Его требуется вводить значительно реже, что удобнее для пациентов [300]. Вместе с тем короткий период полужизни blinatumomab позволяет оперативно понизить концентрацию препарата в циркуляции в случае развития тяжелых побочных эффектов.

Следует отметить, что в клиническую практику лечения онкологических заболеваний вошел ряд других биспецифичных активаторов Т-клеток, также осуществляющих их таргетинг к опухолям посредством взаимодействия с ко-рецептором CD3 [301, 130]. Значительная часть этих препаратов создана на основе полноразмерных антител, однако среди них встречаются и неклассические форматы, не относящиеся к фрагментам антител. Так, glofitamab с молекулярной

массой 194 кДа обладает уникальной структурой, характеризующейся бивалентным связыванием с CD20-экспрессирующими опухолевыми В-клетками и моновалентным связыванием с CD3 на Т-клетках (два анти-CD20 Fab и один анти-CD3 Fab). Он одобрен для лечения рецидивирующей или рефрактерной В-клеточной неходжкинской лимфомы. Особое место занимает одобренный для терапии увеальной меланомы препарат tebentafusp, который относится к классу ImmTAC (Immune-mobilising monoclonal TCR against cancer) [302]. Он представляет собой фьюжн-белок растворимого Т-клеточного рецептора (TCR), специфичного к комплексу gp100/HLA-A*02:01 на клетках меланомы, и анти-CD3 scFv-фрагмента, с общей молекулярной массой 76 кДа. Принципиальное отличие tebentafusp от других биспецифичных активаторов Т-клеток состоит в использовании TCR вместо переменных доменов антитела для связывания опухолевой клетки. По этой причине, он способен распознавать внутриклеточно процессированные пептидные антигены, презентируемые в контексте главного комплекса гистосовместимости (МНС), недоступные для классических антител.

Последним фрагментом, который мы рассмотрим в этом разделе, является envafolimab – фьюжн-белок формата VHH-Fc, состоящий из двух анти-PD-L1 однодоменных верблюжьих (VHH) антител и Fc-фрагмента человеческого IgG1. Препарат был одобрен в Китае в 2021 году для лечения ряда солидных опухолей, а также получил статус орфанного препарата в США. Fc-фрагмент белка был модифицирован для минимизации эффекторных функций, что позволяет ему не уничтожать экспрессирующие PD-L1 клетки (включая иммунные), а действовать исключительно как блокатор соответствующей контрольной точки иммунитета [303].

1.4.4. Конъюгаты фрагментов антител с лекарствами.

На начало 2026 года ни один конъюгат фрагмента антитела с лекарством (FDC, fragment-drug conjugate) не одобрен для клинического применения, однако несколько молекул этого класса в последние годы перешли в клинические исследования в онкологии. Примечательно, что даже в случае столь молодого с клинической точки зрения класса препаратов, как конъюгаты фрагментов антител с лекарствами, несколько первых молекул, достигших испытаний на людях, представляют собой биспецифичные конструкции.

Одним из таких препаратов является биспецифичный FDC JSKN022 формата VHH-Fc, разработанный компанией Alphamab Oncology [304]. Он содержит два VHH, специфичных к PD-L1 и интегрину $\alpha V\beta 6$ соответственно, связанных через Fc-фрагмент антитела, который обеспечивает увеличение периода полужизни препарата за счет FcRn-зависимой рециркуляции. Разработчик заявляет, что помимо цитотоксического эффекта лекарства класса ингибиторов топоизомеразы I, конъюгированного к гликанам Fc-фрагмента с DAR 4, JSKN022 блокирует ось PD-L1/PD-1, восстанавливая активность Т-клеток, и ось интегрин $\alpha V\beta 6$ /TGF- β , снижая

иммуносупрессивное воздействие стромального микроокружения опухоли. Препарат проходит I фазу клинических испытаний в Китае у пациентов с агрессивными солидными опухолями (исследование ChiCTR2500110741).

Еще одним биспецификом, недавно поступившим в клинические исследования в Китае и США (NCT06928363), является анти-EGFR/c-Met конъюгат KY-0301 / RB-601 компании Novatim Immune Therapeutics. По аналогии с описанным выше конъюгатом, он содержит по одному VHH домену, специфичному к EGFR и c-Met, объединенных посредством Fc-фрагмента. KY-0301 несет 4 молекулы MMAE, конъюгированные к антителу с использованием валин-цитруллинового линкера. Его особенностью является намеренно сниженное сродство к EGFR, которое позволяет минимизировать связывание с нормальными клетками, экспрессирующими только EGFR. В то же время, совместная экспрессия EGFR и c-Met на поверхности опухолевых клеток обеспечивает эффективную интернализацию конъюгата в клетки [305].

Наряду с платформами, основанными на рецептор-опосредованной интернализации конъюгатов, развиваются и стратегии, направленные на неинтернализующиеся мишени. FDC TGW101 компании Tagworks Pharmaceuticals представляет собой диабоди, специфичное к неинтернализующемуся опухоль-ассоциированному гликопротеину 72 (TAG72), конъюгированное с MMAE посредством транс-циклооктенового линкера [199]. Дизайн линкера предусматривает внеклеточное высвобождение лекарства в результате клик-реакции с химическим активатором, вводимым на втором этапе терапии [306]. Препарат также проходит клинические исследования (NCT06959706).

Помимо нескольких конъюгатов фрагментов антител с лекарствами, уже достигших клинических исследований, ряд молекул показал высокую эффективность в животных моделях рака [7]. Некоторые из них также демонстрируют превосходство в проникновении в опухоль и/или терапевтической активности в сравнении с полноразмерными ADC идентичной антигенной специфичности. Так, в одном из ранних исследований было проведено сравнение анти-CD30 конъюгата диабоди-MMAF с классическим ADC с идентичным DAR 4 [290]. Несмотря на примерно 30-кратно более короткое время циркуляции FDC в крови, для достижения его сопоставимой эффективности *in vivo* в ксенографтной мышинной модели рака в сравнении с ADC потребовалась лишь в 3 раза большая доза препарата. Это наглядно демонстрирует, что эскалация дозы FDC может позволить компенсировать ускоренный клиренс молекулы.

Исследования с форматом однодоменных антител (sdAb) еще меньшего размера дополнительно подчеркивают преимущества быстрого проникновения в опухоль и оптимизированной кинетики связывания с антигеном. Wu et al. [307] показали, что конъюгат 5T4-специфичного sdAb с производным камптотецина SN-38 (DAR 1), несмотря на значительно более

быстрый системный клиренс, демонстрировал в 12 раз более высокое накопление в опухоли через 1 ч после внутривенного введения и более сильно подавлял рост опухолей в сравнении с конъюгатом на основе IgG (DAR~6). Авторы связали полученный результат с меньшим размером FDC, способствующим проникновению в опухоль, а также с более высокой скоростью диссоциации комплекса sdAb с антигеном, что снижает эффект барьера связывающих сайтов.

Схожие закономерности продемонстрированы в исследовании Thurber и коллег [308], где моновалентный анти-PSMA конъюгат на основе sdAb, будучи менее активным *in vitro*, оказался более эффективным *in vivo*, чем его быстро интернализирующаяся бивалентная версия. Это преимущество авторы связали с более медленной интернализацией моновалентного FDC, позволяющей препарату проникать глубже в опухоль и доставлять летальную дозу лекарства к большей доле опухолевых клеток, тогда как бивалентный формат поглощался барьером связывающих сайтов на периферии опухоли. Результаты работы бросают вызов устоявшейся в разработке конъюгатов антител с лекарствами практике, ориентированной на отбор наиболее аффинных и быстро интернализирующихся молекул, предоставляя пример, в котором распределение молекулы по опухоли играет более значимую роль в определении эффективности терапии, нежели суммарное накопление в опухоли.

Формат минибоди, исходно используемый в контексте диагностики рака [257], в последние годы приобрел значение и как терапевтическая платформа. В работе Douez et al. [291], анти-HER2 минибоди, конъюгированное с MMAE (DAR 4) посредством линкера на основе разветвленного ПЭГ, экранирующего избыточную гидрофобность лекарства, эффективно ингибировало рост опухолей РМЖ в ксенографтной мышинной модели, и в условиях эскалации дозы превосходило по эффективности полноразмерный ADC T-DM1. В другом исследовании, Neri и коллеги [198] показали, что конъюгат аналога минибоди формата SIP и майтанзиноида DM1, направленный на неинтернализирующуюся мишень EDA-домен фибронектина, обеспечивал более эффективное ингибирование роста опухолей у мышей как в эквивалентной, так и в эквимольной дозировке по сравнению с классическим ADC идентичной специфичности с таким же DAR 2. Авторы пришли к выводу, что более высокое накопление FDC в опухоли в первые часы после внутривенного введения в сочетании с более быстрым высвобождением лекарства из конъюгата обеспечило повышенную эффективность формата на основе фрагмента антитела.

1.5. Стратегии GD2-специфичной иммунотерапии рака.

1.5.1. Канонические полноразмерные антитела.

Ганглиозид GD2 является наиболее клинически валидированной мишенью в иммунотерапии нейробластомы [52], а также активно рассматривается в качестве мишени в

терапии ряда сарком, меланомы, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, и некоторых опухолей ЦНС [309, 26]. Разработан широкий спектр противоопухолевых GD2-специфичных препаратов различных форматов, однако к началу 2026 года лишь три полноразмерных моноклональных антитела, полученные из двух мышинных клонов, – dinutuximab (Unituxin), dinutuximab beta (Qarziba) и naxitamab (Danyelza) – одобрены для клинического использования при рецидивирующей / рефрактерной нейробластоме у детей.

Создание удачных вариантов GD2-специфичных антител сопряжено с рядом принципиальных трудностей. Во-первых, сложности возникают при получении антител достаточной аффинности и специфичности, которые могли бы индуцировать Fc-зависимую цитотоксичность в отношении GD2-положительных клеток. Поскольку в иммунном ответе к углеводам обычно отсутствует T-клеточная поддержка, антитела к очищенным ганглиозидам часто производятся в виде молекул IgM с низкой аффинностью и ограниченной способностью к переключению изотипов иммуноглобулинов, а они обычно не представляют интереса при создании терапевтических антител [310]. Во-вторых, достаточно сильная структурная гомология между различными ганглиозидами может приводить к кросс-реактивности создаваемых анти-GD2 антител к его соседям по пути биосинтеза. Дополнительной проблемой в терапии выступает то, что GD2-специфичные антитела часто характеризуются токсичностью по отношению к здоровым тканям, экспрессирующим GD2, вызванной активацией системы комплемента (СМС). В то время как гематоэнцефалический барьер в норме предотвращает попадание внутривенно введенных анти-GD2 антител в ЦНС, одним из главных побочных эффектов у пациентов выступает нейропатическая боль вследствие гиперактивации системы комплемента на здоровых периферических нейронах [311].

Так как очищенные ганглиозиды являются слабыми иммуногенами, разработка анти-GD2 антител, как правило, основывается не на иммунизации растворимым антигеном (что типично для многих белковых антигенов), а на альтернативных стратегиях. Два наиболее клинически значимых семейства анти-GD2 mAb – 14.18 и 3F8, послуживших основой для создания dinutuximab и naxitamab соответственно, – были получены путем иммунизации мышей опухолевыми клетками, экспрессирующими GD2, с последующим отбором гибридом, специфичных к нативному GD2 на поверхности клеток. Этот аспект имеет важное значение, поскольку мембранный контекст презентации антигена, по всей видимости, способствовал идентификации редких клонов, специфичных к нативной конформации гликолипида, релевантной для терапевтического применения. Дополнительные стратегии по созданию анти-GD2 антител, играющие существенную роль и в разработке вакцин против GD2, включают использование химически модифицированных или конъюгированных форм GD2 (например, лактонных производных ганглиозида, связанных с носителем белком KLH) в сочетании с

адьювантами, а также антиидиотипические антитела и мимотопы GD2, в которых природный гликолипид замещен более иммуногенными структурными аналогами [312, 26].

Семейство мышинных моноклональных антител 14.18/14G2a было получено Ральфом Райсфельдом и коллегами из Института Скриппс в США в конце 1980-х годов [37, 313, 314]. На их основе создано химерное антитело *dinutuximab* (ch14.18), в котором переменные домены мышинового антитела 14.18 были слиты с константными доменами человеческого IgG1 [315]. *Dinutuximab* стал первым анти-GD2 препаратом, одобренным FDA для терапии нейробластомы в 2015 году. Клиническое исследование, послужившее основанием для регистрации препарата, показало увеличение выживаемости без прогрессирования (EFS: $66 \pm 5\%$ против $46 \pm 5\%$) и общей выживаемости (OS: $86 \pm 4\%$ против $75 \pm 5\%$) через 2 года у пациентов с нейробластомой высокого риска при применении *dinutuximab* в комбинации с изотретиноином и цитокинами (GM-CSF и IL-2) по сравнению со стандартной поддерживающей терапией (монотерапия изотретиноином) [316]. Данные долгосрочного наблюдения в рамках того же исследования подтвердили преимущество иммунотерапии [47]. Активность *dinutuximab* в основном реализуется за счет Fc-зависимых цитотоксических механизмов ADCC, ADCP и CMC, при этом ряд исследований отводит ключевую роль механизму антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [317].

В 2017 году Европейским регулятором ЕМА одобрено [318] антитело идентичной аминокислотной структуры *dinutuximab beta*, получаемое в клеточной линии яичников китайского хомячка (CHO) вместо линии мышинной миеломы SP2/0 в случае оригинального *dinutuximab*. Вариант, продуцируемый клетками CHO, характеризовался более сильным противоопухолевым NK-клеточным ответом за счет модифицированного профиля гликозилирования антитела, и при этом сохранял высокие антиген-связывающие свойства с GD2 [319]. С 2022 года *dinutuximab beta* одобрен для применения в России [2].

Кроме этого, получен гуманизированный вариант антитела hu14.18K322A с потенциально более низкой иммуногенностью и сниженной способностью активировать систему комплемента относительно исходного химерного ch14.18 [311]. Практически полностью отсутствующий механизм CDC за счет введения точечной мутации в Fc-фрагмент антитела не приводил к снижению противоопухолевых эффектов в сравнении с ch14.18 в доклинических исследованиях, и одновременно наблюдалось снижение нейропатической боли у пациентов с нейробластомой [320]. Ожидается также усиление механизма ADCC вследствие модификации профиля гликозилирования в положении Asn297 Fc-фрагмента в ходе продукции антитела в крысиной клеточной линии YB2/0. Hu14.18K322A проходит клинические исследования (исследование фазы II/III NCT07549321 и др.).

Мышиное антитело 3F8 [321, 322] было первым GD2-специфичным антителом, испытанным на пациентах с метастазирующей нейробластомой еще в 1987 году [323]. 3F8 демонстрировало выраженную терапевтическую активность в пациентах, что связали с высокой активацией механизма СМС, однако большинство пациентов проявило сильные побочные эффекты в виде выработки высоких титров антител против мышиных антител (НАМА-ответ), а также быструю элиминацию 3F8 из кровотока посредством нейтрализующих антител [3]. Гуманизированное мАТ пахитамаб (hu3F8) подкласса IgG1 создавалось специально для того, чтобы предотвратить высокие уровни анти-лекарственных антител, которые вырабатывались *in vivo* в ответ на предшественники из его семейства, и было одобрено FDA для терапии пациентов с нейробластомой высокого риска в 2020 году [324].

Помимо иммуноопосредованных Fc-зависимых механизмов действия, для GD2-специфичных антител семейств 14.18 [314, 325, 326], 3F8 [327] и других семейств [57] показано, что их связывание с опухолевыми клетками способно напрямую подавлять пролиферацию опухолей и индуцировать клеточную гибель. Как уже отмечалось в **главе 1.1**, в различных культурах GD2-положительных опухолевых клеток данные антитела вызывают морфологические изменения и гибель клеток, а также ингибируют ключевые пролиферативные сигнальные пути, такие как путь PI3K/Akt/mTOR и путь MAPK, которые часто конститутивно активированы в опухолях. Несмотря на то, что механизмы прямой клеточной гибели, по-видимому, вносят меньший вклад в противоопухолевые эффекты анти-GD2 антител *in vivo* по сравнению с Fc-зависимыми механизмами, их значимость также подтверждена в ряде экспериментальных работ. В частности, в работе нашей лаборатории [328] в сингенной мышинной модели GD2-положительной лимфомы EL-4 показана противоопухолевая активность как полноразмерного антитела 14G2a, так и его Fab-фрагмента. Эффекты Fab-фрагмента были ниже по сравнению с антителом, что отчасти может объясняться его более коротким периодом полужизни в организме.

Важные данные получены в работе Cochonneau et al. [329] с использованием антитела 8B6, специфичного к OAcGD2 – ацетилированной форме GD2, характеризующейся более ограниченной экспрессией в нормальных тканях. Авторы показали, что однократное внутривенное введение данного антитела подавляет рост опухоли у иммунодефицитных мышей NOD/SCID. Поскольку у мышей данной линии в значительной степени выключены механизмы ADCC и СМС, наблюдаемый противоопухолевый эффект, по всей видимости, обусловлен прямым цитотоксическим действием антитела. Применение OAcGD2-специфичных антител на сегодняшний день ограничено исследованиями в животных моделях, однако их терапевтический потенциал представляется значительным, поскольку ограниченная экспрессия в нормальных

тканях в сравнении с GD2 потенциально снижает вероятность их связывания с периферическими нервными волокнами и проявление побочных эффектов [44].

1.5.2. Другие стратегии терапии.

Клинической стадии разработки достигло значительное число GD2-специфичных препаратов, не являющихся голыми полноразмерными антителами. Примечательно, что большинство этих препаратов представляют собой производные одного из двух семейств антител 14.18 или 3F8, а не используют принципиально новые анти-GD2 паратопы. Ряд ключевых стратегий проиллюстрирован на **рисунке 1.11**.

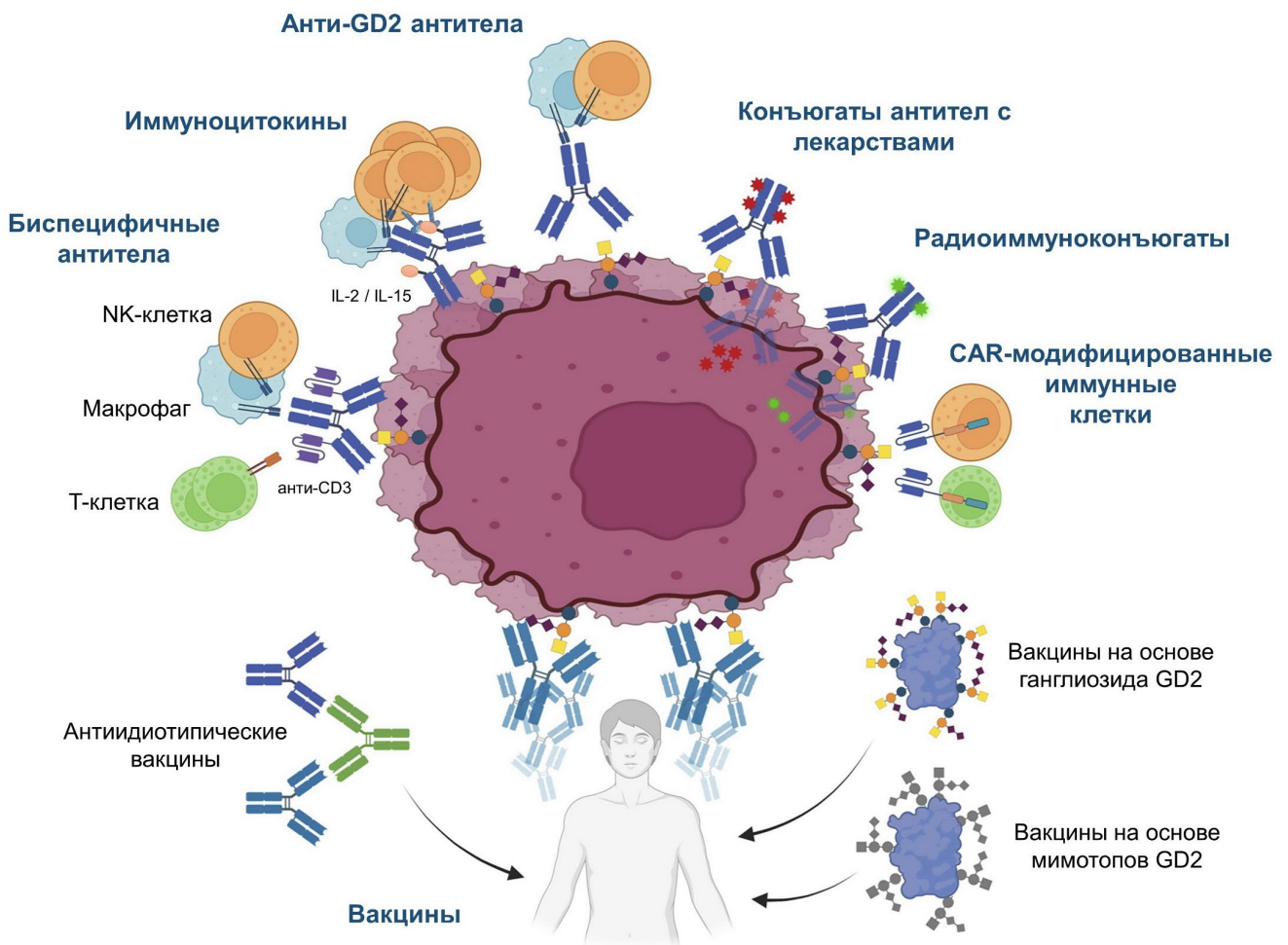


Рисунок 1.11. Основные стратегии GD2-специфичной терапии рака. CAR – химерный антигенный рецептор. На основе [26].

Одно из наиболее активно развивающихся направлений GD2-специфичной терапии связано с адресной доставкой различных эффекторных молекул к опухолям посредством антител. Первым из таких подходов выступают **конъюгаты антител с радиоизотопами**. Ряд радиоактивно-меченных антител одобрены для терапии радиочувствительных гематологических опухолей, таких как лимфомы, где они демонстрируют высокую эффективность.

Радиоиммуноконъюгаты, направленные против солидных опухолей, широко применяются в качестве диагностических агентов, однако зачастую характеризуются ограниченным терапевтическим потенциалом вследствие высокой радиорезистентности солидных новообразований, поскольку эффективная доза излучения, необходимая для их эрадикации, как правило, в 5-10 раз превышает таковую для гематологических опухолей [330]. Редким примером одобренного для терапии солидной опухоли радиоиммуноконъюгата выступает анти-CD147 ^{131}I -metuximab (Licartin) – (Fab')₂-фрагмент, одобренный в Китае для терапии гепатоцеллюлярной карциномы. Дополнительным препятствием для широкого клинического внедрения радиоиммунотерапии служит сложная логистика транспортировки и введения препаратов, а также потребность в высококвалифицированных специалистах в области ядерной медицины.

Исторически подходы к анти-GD2 радиоиммунотерапии базировались на использовании антител, непосредственно меченных β -излучающими изотопами. Внутривенное введение ^{131}I -3F8 детям с метастатической нейробластомой не продемонстрировало улучшения выживаемости по сравнению с терапией немеченым антителом 3F8. Попытка снижения системной токсичности посредством введения ^{131}I -3F8 непосредственно в спинномозговую жидкость через резервуар Оммаи оказалась умеренно успешной у пациентов с рецидивирующей нейробластомой с метастазами в ЦНС и у пациентов с метастатической медуллобластомой, обеспечив длительную ремиссию у части детей [331]. Тем не менее системное применение классических анти-GD2 радиоиммуноконъюгатов часто ограничено неприемлемой гематологической токсичностью, поскольку медленный клиренс IgG из кровотока приводит к дозолимитирующему облучению костного мозга задолго до того, как солидная опухоль получит необходимую терапевтическую дозу излучения.

Для преодоления данного ограничения разработаны стратегии предварительного таргетинга опухолей (pre-targeting). Одной из платформ, разрабатываемой специально для терапии GD2-экспрессирующих опухолей, является система самосборки и диссоциации SADA (Self-Assembling and DisAssembling) от компании Y-mAbs Therapeutics. Она проходит клиническое исследование фазы I в пациентах с различными GD2-положительными опухолями (NCT05130255) [332]. Платформа разделяет фазу таргетинга опухоли и фазу доставки радиоизотопа. В ее основе лежит биспецифичный фрагмент антитела формата bis-scFv, сконструированный для связывания с GD2 на поверхности опухоли и одновременно содержащий домен захвата низкомолекулярного хелатора DOTA. После внутривенного введения мономеры SADA (~70 кДа) тетрамеризуются на GD2-экспрессирующих клетках, а несвязанные мономеры быстро выводятся почками. В этот момент пациенту вводят β -излучатель ^{177}Lu или α -излучатель ^{225}Ac в виде комплексов с DOTA, которые захватываются тетрамерами SADA, а в случае

отсутствия связывания с мишенью быстро выводятся из организма, обеспечивая крайне низкий уровень системного облучения.

В контексте **конъюгатов антител с низкомолекулярными лекарствами (ADC)**, к настоящему моменту проведено относительно небольшое количество исследований. Еще в 1998 году Lode et al. [333] получили конъюгат мышинового антитела 14G2a и аналога калихеамицина $\theta 1$, присоединенного по модифицированным лизинам антитела, и показали, что ADC значительно подавляет метастазы в печени в диссеминирующей мышиной модели нейробластомы. Долгое время в литературе отсутствовали другие работы по данной тематике. В 2024 году компания Merck KGaA инициировала первое клиническое исследование анти-GD2 ADC в пациентах от 18 лет и старше с саркомой мягких тканей и глиобластомой (исследование фазы I NCT06641908) [334, 335]. ADC M3554 представляет собой модифицированный вариант hu14.18, конъюгированный с ингибитором топоизомеразы I DXd (с DAR 8) по межцепочечным цистеинам антитела посредством расщепляемого β -глюкуронидного линкера. В структуру Fc-фрагмента hu14.18 внесены точечная мутация K322A с целью исключения механизма СМС и другие модификации с целью ослабления Fc γ R-зависимых эффекторных функций. Данные об эффективности и безопасности конъюгата в пациентах на сегодня отсутствуют.

Поскольку реализация противоопухолевой активности анти-GD2 mAb частично зависит от привлечения к опухоли эффекторных иммунных клеток, таких как NK-клетки и макрофаги, одним из направлений развития области стала разработка **иммуоцитокинов**. Иммуоцитокины представляют собой фьюжн-белки, чаще всего состоящие из молекулы IgG и цитокина, присоединенного к С-концу тяжелой либо легкой цепи антитела (встречаются и иммуоцитокины на основе фрагментов антител – например форматы молекул от компании Philogen, находящиеся в клинических исследованиях) [336]. Функциональная логика применения иммуоцитокинов заключается в обеспечении локальной концентрации и активации иммунных клеток непосредственно в микроокружении опухоли.

Единственными анти-GD2 иммуоцитокинами, по которым имеется существенный опыт клинического применения, выступают молекулы на основе интерлейкина-2. Наиболее изучен формат hu14.18-IL2, где IL-2 присоединен к карбоксильным концам тяжелых цепей антитела. В исследовании II фазы данная конструкция продемонстрировала эффективность у части пациентов с нейробластомой, и вместе с тем общая терапевтическая целесообразность применения IL-2 остается предметом дискуссий, поскольку использование высоких доз сопряжено с выраженной токсичностью, а эффективность низких доз не доказана [337]. В недавнем клиническом исследовании (NCT03209869) изучалась комбинация hu14.18-IL2 с *ex vivo*

экспансированными гаплоидентичными НК-клетками (полученными от доноров с полусовместимостью по системе HLA). Еще одной интересной стратегией комбинированной терапии, продемонстрировавшей высокую эффективность в доклинических исследованиях, является сочетание интратуморального введения hu14.18-IL2 с лучевой терапией: такая комбинация обеспечила значительно более выраженный противоопухолевый эффект в мышцах по сравнению с каждым из подходов в отдельности [338, 339]. На основании этих результатов инициировано клиническое исследование в пациентах с прогрессирующей меланомой (NCT03958383), направленное на оценку эффективности комбинации лучевой терапии и анти-GD2 иммуноцитокина, а также дополнительного применения ингибиторов контрольных точек иммунитета PD-1 и CTLA-4.

Иммуноцитокины на основе IL-15 представляют интерес в терапии GD2-положительных опухолей, поскольку IL-15 обладает более высокой и направленной в сравнении с IL-2 способностью к активации НК-клеток на фоне сниженного риска развития синдрома повышенной проницаемости капилляров. Сравнительный анализ эффективности IL-2 и IL-15 в комбинации с анти-GD2 антителами в PDX модели нейробластомы продемонстрировал превосходство IL-15 в усилении антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) [340]. Hu14.18-IL15 также превзошел hu14.18-IL2 (человеческие цитокины, кросс-реактивные к мышам) по эффективности в сингенной мышинной модели нейробластомы [341].

Значимое место среди клинических исследований в GD2-положительных опухолях отведено различным форматам **биспецифичных антител**. Среди них, ведущую роль играют препараты класса активаторов Т-клеток (TCE), которые связывают GD2 на клетках опухоли и одновременно осуществляют ретаргетинг Т-клеток к опухоли посредством взаимодействия с ко-рецептором CD3.

Первым из таких препаратов выступает nivatrotamab (hu3F8-BsAb / hu3F8-huOKT3) – молекула формата IgG-scFv, состоящая из анти-GD2 антитела hu3F8 и двух анти-CD3 scFv-фрагментов, слитых с С-концами легких цепей антитела. Схематичное строение nivatrotamab представлено на **рисунке 1.11**. Fc-фрагмент антитела был агликозилирован по сайту N297 с целью предотвращения активации комплемента и развития цитокинового шторма [342]. Препарат продемонстрировал высокий противоопухолевый потенциал в ксенографтной модели меланомы человека, что привело к эффективной элиминации опухоли при отсутствии ингибирующего воздействия на задействованные Т-клетки [343]. Интересно, что в этом же исследовании авторы в ряде функциональных *in vitro* тестов сравнили nivatrotamab с Т-клетками, генно-модифицированными химерным антигенным рецептором (CAR, последовательность на

основе hu3F8), и привели аргументы в пользу преимущества формата биспецифичного антитела перед использованием CAR-модифицированных Т-клеток применительно к GD2-положительным опухолям. Так, было показано, что большинство CAR-Т-клеток подвергались деплеции при контакте с GD2-положительными клетками, тогда как Т-клетки, таргетируемые биспецифичным антителом, сохраняли жизнеспособность; использование CAR с более низкой аффинностью, включение ко-стимулирующего домена 4-1BB во внутриклеточную часть рецептора или блокада PD-1 не предотвращали истощение CAR-Т-клеток. Nivatrotamab перешел в клинические исследования пациентов с нейробластомой, остеосаркомой и рядом других онкологических заболеваний (исследования NCT03860207 и NCT04750239); позже исследования были прекращены по коммерческим причинам, а не по терапевтическим основаниям, что следует учитывать при интерпретации отсутствия клинических данных. Отдельно этим же коллективом исследователей получен функционально схожий биспецифичный фрагмент антитела hu3F8-scBA (формат bis-scFv), который эффективно активировал Т-клетки и индуцировал гибель GD2-положительных опухолевых клеток *in vitro*, а также увеличивал выживаемость мышей в ксенографтных моделях нейробластомы и меланомы [344].

Следующий концептуально близкий подход предполагает использование *ex vivo* активированных аутологичных (полученных от пациента) Т-клеток, предварительно «вооруженных» биспецифичными антителами. Анти-GD2/CD3 антитело, полученное посредством химической гетероконъюгации hu3F8 и ОКТ3-специфичного mAb, связывает CD3 Т-клеток, после чего такие Т-клетки (bispecific antibody-armed T cells, BAT) вводятся обратно пациенту. Поскольку Т-клетки проходят активацию до инфузии пациенту, они не нуждаются в праймировании *in vivo* для инициации цитотоксической активности. GD2-BAT показали высокую эффективность в доклинических исследованиях, что привело к запуску клинического исследования фазы I/II в пациентах с нейробластомой и остеосаркомой (NCT02173093) [345]. Параллельно, успешные результаты в мышинных моделях рака были продемонстрированы для GD2-BAT, в которых применялся рекомбинантный аналог nivatrotamab [346].

Биспецифичное антитело Ektomun, которое создатели классифицируют как трифункциональное, предназначено для одновременного привлечения к GD2-экспрессирующим клеткам опухоли Т-клеток и клеток, несущих Fcγ-рецепторы. Это должно позволить расширить его механизм действия по сравнению с другими активаторами Т-клеток и способствовать формированию долгосрочной противоопухолевой иммунологической памяти. Ektomun получен на основе мышинового анти-GD2 клона ME36.1, и структурно представляет собой полноразмерное антитело с двумя Fab-фрагментами, специфичными к GD2 и человеческому CD3 соответственно. Терапия препаратом показала высокую эффективность в ко-культуре нейробластомы с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) человека. Его аналог Surek,

использующий Fab-фрагмент, специфичный к мышиному, а не человеческому CD3, демонстрировал более эффективный контроль роста опухоли по сравнению с анти-GD2 антителом *dinutuximab* в мышинной модели метастазирующей нейробластомы [347], а комбинация *Surek* с блокадой контрольной точки иммунитета PD-1 индуцировала еще более сильный противоопухолевый иммунный ответ в мышах [348].

Биспецифичные антитела, нацеленные одновременно на GD2 и дополнительные опухолеассоциированные антигены, представляют собой значительно менее изученную область по сравнению с рассмотренными выше активаторами Т-клеток, однако и здесь имеются заслуживающие внимания примеры. Так, было получено биспецифичное антитело, связывающее GD2 и B7-H3 (CD276) – потенциальную контрольную точку иммунитета, гиперэкспрессированную в широком спектре опухолей, включая нейробластому, и при этом характеризующуюся ограниченной экспрессией в здоровых тканях организма [349]. Особенностью конструкции является субоптимальная аффинность каждого из Fab-фрагментов антитела, и поэтому для достижения высокой avidности связывания с клеткой требуется одновременная колокализация обоих антигенов на поверхности одной и той же клетки. Препарат продемонстрировал существенно более высокую специфичность связывания с опухолью в сравнении с *dinutuximab* в мышинной модели GD2⁺/B7-H3⁺ меланомы, при этом отсутствие детектируемого связывания с нервной тканью указывает на его потенциально более широкое терапевтическое окно, открывая возможность для применения доз, превышающих максимально переносимую для моноспецифичных анти-GD2 антител. Данное преимущество может быть распространено на конъюгаты GD2-специфичных антител с лекарствами и другими эффекторными молекулами. Связанное с вышеупомянутым исследованием биспецифичное антитело INV724 в 2024 году получило статус орфанного препарата для терапии нейробластомы в США.

Адоптивная терапия собственными Т-лимфоцитами пациента, генетически модифицированными для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR), специфичных к опухолевым антигенам, показывает высокую эффективность при лечении ряда гематологических злокачественных новообразований, и предпринимаются активные попытки по использованию данного подхода в терапии солидных опухолей. Тем не менее, существуют дополнительные ограничения, препятствующие развитию CAR Т-клеточной терапии солидных опухолей. К ним относятся ограниченная способность CAR Т-клеток проникать в опухолевую ткань из-за физических барьеров, создаваемых стромой опухоли, а также разнообразные иммуносупрессивные механизмы в микроокружении опухоли, подавляющие функциональную активность Т-клеток [350, 351].

CAR T-клетки, направленные на ганглиозид GD2, были одной из первых терапий данного класса, достигших стадии клинических исследований в солидных опухолях. Повышенный интерес к GD2 в контексте клеточной терапии нейробластомы во многом обусловлен тем, что он экспрессируется большинством клеток данной опухоли с высокой плотностью, что сводит к минимуму риск ускользания опухоли вследствие потери антигена в ходе длительных курсов терапии. В большинстве проведенных к сегодняшнему дню клинических исследований, в качестве антиген-связывающего внеклеточного домена анти-GD2 CAR использованы scFv-фрагменты, являющиеся производными семейства антител 14.18 [352]. Хотя для запуска T-клеточного ответа обязателен базовый уровень аффинности рецептора к антигену, доклинические исследования анти-GD2 CAR T-клеток показали, что оптимальная эффективность зачастую достигается при средних значениях аффинности – именно в этом диапазоне находится семейство 14.18 по сравнению с более высокоаффинным семейством 3F8. Чрезмерно высокая аффинность связывания может приводить к быстрому иммунологическому истощению и деплеции T-клеток вследствие их гиперактивации при контакте с антигеном.

Первый клинический опыт применения анти-GD2 CAR T-клеток [353] продемонстрировал, что аутологичные цитотоксические T-лимфоциты, специфичные к вирусу Эпштейна-Барр (EBV), и модифицированные рецептором, состоящим из внеклеточного домена scFv на основе последовательности антитела 14.18 и внутриклеточного активационного домена CD3 ζ (индукция TCR-подобного «сигнала 1»), способны вызывать объективный клинический ответ у педиатрических пациентов с нейробластомой, уже прошедших несколько курсов альтернативной терапии. Использование EBV-специфичных цитотоксических T-клеток пациента вместо общей популяции периферических T-клеток было обосновано тем, что эндогенная стимуляция через нативный TCR, распознающий EBV-инфицированные клетки, должна была обеспечить костимулирующий «сигнал 2», тем самым повышая выживаемость клеток *in vivo*. Длительное наблюдение в рамках того же исследования выявило персистенцию CAR T-клеток на низком уровне в течении 4 лет после инфузии, сопровождавшуюся полной ремиссией у небольшой подгруппы пациентов [354]. Более поздние разработки этой же исследовательской группы, направленные на лечение нейробластомы, включают создание CAR с несколькими внутриклеточными костимуляторными доменами (iC9-GD2-CD28-OX40; клиническое исследование NCT01822652) [355], а также одновременное оснащение T-клеток конститутивно активированным рецептором интерлейкина-7 для повышения их выживаемости в агрессивном микроокружении педиатрических солидных опухолей (C7R-GD2.CART; NCT03635632) [356].

Одним из наиболее успешных на сегодняшний день клинических исследований анти-GD2 CAR T-клеточной терапии у пациентов с рецидивирующей/рефрактерной нейробластомой является исследование фазы I/II NCT03373097, в рамках которого изучался препарат GD2-

CART01 [357, 358]. В данной работе применялись аутологичные CAR T-клетки, несущие рецептор на основе scFv-фрагмента семейства 14.18 с двумя внутриклеточными костимуляторными доменами – CD28 и 4-1BB. Клетки также ко-экспрессировали индуцибельный трансген каспазы-9 (iC9), выполняющий функцию «суицидальной» системы безопасности. Наличие iC9 или альтернативной системы безопасности позволяет элиминировать модифицированные клетки при развитии угрожающих жизни побочных эффектов (например, при потенциальных нейротоксических эффектах вследствие связывания с GD2 на здоровых нервных тканях; или при тяжелом синдроме высвобождения цитокинов, СБЦ). Многие современные конструкции анти-GD2 CAR T-клеток включают подобные системы. Терапия препаратом GD2-CART01 продемонстрировала благоприятный профиль безопасности (преимущественно СБЦ низкой степени) и индуцировала устойчивый терапевтический ответ более чем у половины пациентов.

В отдельной работе [359] этой же группы исследователей было недавно показано, что ALLO_GD2-CART01 – аллогенный аналог описанной выше аутологичной программы GD2-CART01 – демонстрирует выраженную экспансию T-клеток и значимую эффективность у пациентов с нейробластомой, исчерпавших иные терапевтические возможности. Источником T-клеток для пациентов служили лимфоциты, полученные от доноров, ранее предоставивших им же материал для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Такой подход делает терапию доступной для пациентов с выраженной лимфопенией или недостаточным количеством T-клеток для аутологичного производства. Примечательно, что поскольку клетки были получены от совместимого донора, а не от полностью несовместимых лиц, это позволило не проводить генетическую модификацию нативного TCR для предотвращения летальной токсичности; в результате у большинства пациентов наблюдались лишь умеренная острая реакция «трансплантат против хозяина» и СБЦ II–III степени.

Эффективность GD2-специфичных CAR T-клеток в лечении ряда опухолей ЦНС продемонстрирована в животных моделях, а с недавнего времени — и в клинической практике [309]. Вероятно, наиболее значимая на сегодняшний день работа посвящена применению CAR T-клеточной терапии против диффузной срединной глиомы, несущей мутацию гистона H3 K27M, и характеризующейся высокой экспрессией ганглиозида GD2 [360]. В рамках клинического исследования (CAR GD2.4-1BB.CD3 ζ , исследование NCT04196413) при этой и иных случаях фатальной опухоли головного мозга наблюдались значительная регрессия опухоли и улучшение неврологических функций [361].

В целом, накопленный клинический опыт свидетельствует о том, что GD2 является подходящей поверхностной мишенью для CAR T-клеточной и других стратегий клеточной иммунотерапии [352]. Механизмы действия анти-GD2 CAR T-клеток, достигших стадии

клинических исследований, существенно различаются в зависимости от выбора комбинаций используемых внутриклеточных костимуляторных доменов (например, CD28, 4-1BB и/или ОХ40), а также от наличия цитокиновой поддержки (например, введения в клетку конститутивно активированного С7R, трансгенной экспрессии клеткой IL-15 или системного введения IL-2). Примечательно, что в доклинических исследованиях [362, 363] было показано, что CAR-конструкции на основе антиген-связывающего домена scFv 14.18 индуцируют спонтанное фосфорилирование CD3 ζ и истощение клеток при сочетании с внутриклеточным костимуляторным доменом CD28 вследствие склонности этой комбинации к антиген-независимой тонической сигнализации. При этом, домен 4-1BB был идентифицирован как ингибитор истощения хронически стимулированных анти-GD2 CAR T-клеток, что может объяснить различия в персистенции клеток, наблюдаемые в клинических исследованиях при использовании CAR с разными костимуляторными эндодоменами. Несмотря на значительную стоимость и сравнительную технологическую сложность производства аутологичных CAR-модифицированных клеточных продуктов, обнадеживает тот факт, что тяжелая нейротоксичность в опубликованных исследованиях анти-GD2 CART-терапии встречается редко, а часть пациентов демонстрируют устойчивые ответы на терапию.

2. Материалы и методы.

2.1. Материалы.

Реактивы.

В работе использованы ганглиозид GD2, Tween-20, трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (TCEP), смола Mowiol 4–88, бычий сывороточный альбумин (BSA), этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA (Na₄), ХЧ) (все производства Merck, Германия), маркер молекулярной массы белков «Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder», фетальная бычья сыворотка (FBS), пенициллин, стрептомицин, L-глутамин, проявитель пероксидазной реакции «1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution», агароза (LE, Molecular Biology Grade), DAPI и Hoechst 33342 (все от Thermo Fisher Scientific, США), кумасси бриллиантовый синий R-250 (Bio-Rad, США), додецилсульфат натрия (SDS), 7-AAD (оба от Promega, США), азид натрия (NaN₃, Реахим, Россия), изопропанол (для хроматографии), этанол (C₂H₅OH, ХЧ), соляная кислота (HCl, ХЧ), уксусная кислота ледяная (ХЧ), диметилсульфоксид (DMSO, ХЧ), серная кислота (H₂SO₄, ОСЧ), сульфат аммония ((NH₄)₂(SO₄), ХЧ), гидроксид натрия (NaOH, ХЧ), хлорид натрия (NaCl, ОСЧ), хлорид калия (KCl, ХЧ), дигидрофосфат натрия (NaH₂PO₄, ХЧ), гидрофосфат натрия (Na₂HPO₄, ХЧ), тетрагидрофуран (THF, ХЧ) (все от Компонент-Реактив, Россия), сухое обезжиренное молоко (Roth, Германия), фосфатно-солевой буфер (PBS) в таблетках (Хеликон, Россия), полиэтиленгликоль-малеимид четырехчленный (10 кДа) (JenKem Technology, КНР), ауристатины MC-VC-PAVC-MMAE и MC-VC-PAVC-MMAF (оба от VOC Sciences, США), ауристатины MMAE и MMAF, майтанзиноиды DM1 и DM4, антрациклин доксорубин (все от MedChemExpress, США), sulfo-Cyanine5 NHS-эфир (Cy5) и флуоресцеина 6-малеимид (FAM-малеимид) (оба от Lumiprobe, Россия).

Альдоксорубин (ALDOX) любезно предоставлен William Telford (Center for Cancer Research, National Cancer Institute, США).

Антитела.

В работе использованы анти-GD2 антитела ch14.18, полученные в клетках китайского хомячка CHO DG44 [9], и анти-GD2 минибоди и scFv-фрагменты, полученные в человеческих клетках Expi293F [364].

Также использованы анти-GD2 антитела 14G2a-AF488 и анти-человеческие Fc-специфичные HRP-меченные антитела (оба Santa Cruz Biotechnology, США); анти-FLAG FITC-меченные антитела и анти-FLAG HRP-меченные антитела (оба Merck, Германия).

Растворы и среды.

Для приготовления растворов использована вода классом не ниже дистиллированной. Для работ по получению конъюгатов антител, работ с культурами клеток, приготовления растворов для ввода препаратов мышам, и некоторых других работ использовалась вода, полученная в системе очистки воды Milli-Q (Millipore, США), далее упомянутая как сверхчистая вода.

Если не указано иное, при упоминании в тексте процентного содержания (%) компонента в смеси либо растворе подразумевается массовая доля по отношению к целому.

Буферный раствор PBS: 0.14 М NaCl, 3 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 1.5 мМ KH₂PO₄, pH 7.3. Буферный раствор PBS-T: к раствору PBS добавляли 0.05% Tween-20. Раствор Версена: 0.2 г EDTA (Na₄) на 1 л PBS, pH 7.3 (ПанЭко, Россия). Раствор Версена с добавлением 0.25% трипсина (ПанЭко). Культуральные среды RPMI-1640, EMEM, DMEM (все от Thermo Fisher Scientific). Электродный буферный раствор для электрофореза в полиакриламидном геле: 50 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES, производства Merck), 50 мМ Tris, 0.1% SDS, 1 мМ EDTA растворяли в сверхчистой воде при нагревании до 70°C и перемешивании, pH 7.3.

2.2. Методы работы с белками.

Анализ антител и фрагментов антител в эксклюзионной хроматографии.

Визуализацию антитела, минибоди и scFv-фрагмента, используемых в реакциях конъюгаций с лекарствами, проводили в эксклюзионной хроматографии в изократическом режиме на колонке Superdex 200 10/300 Increase GL (GE Healthcare, США) с использованием системы ВЭЖХ Beckman System Gold (США). Для уравнивания колонки и последующей элюции белков использовали стерилизованный на фильтре 0.22 мкм раствор PBS, приготовленный на сверхчистой воде. Элюцию проводили при скорости потока 0.5 либо 0.75 мл/мин и при комн. т. Детекцию проводили на длине волны 280 нм.

Анализ степени пришивки лекарств к антителу в хроматографии гидрофобных взаимодействий.

Так как лекарства класса ауристатинов обладают значительно более высокой гидрофобностью в сравнении с антителами, конъюгаты антитела с различным количеством пришитых к нему молекул MMAE либо MMAF отличаются различной подвижностью в хроматографии гидрофобных взаимодействий. Конъюгаты с более высокой гидрофобностью сильнее взаимодействуют с гидрофобной стационарной фазой и, следовательно, задерживаются в колонке дольше, чем менее гидрофобные конъюгаты, что позволяет достаточно надежно отделять конъюгаты с различной степенью пришивки друг от друга.

Хроматографический анализ конъюгатов антител с лекарствами ММАЕ либо ММАF, а также параллельно неконъюгированных антител проводили на колонке с гидрофобной стационарной фазой MAbPac HIC-Butyl (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1100 (Agilent Technologies, США); анализ данных проводили в программе DataAnalysis for 6300 Series Ion Trap LC/MS.

Готовили следующие элюенты в сверхчистой воде. Элюент А: 50 мМ натрий-фосфатный буфер с добавлением 2 М сульфата аммония, рН доводили до 7.0 с помощью NaOH. Элюент Б: 50 мМ натрий-фосфатный буфер с добавлением 20% изопропанола, рН доводили до 7.0 с помощью NaOH. Элюенты фильтровали через фильтры 0.22 мкм и дегазировали в течение 20 мин перед проведением хроматографии.

Колонку уравнивали элюентом А и проводили разделение при скорости потока 0.6 мл/мин и комн. т. с детекцией на длине волны 280 нм по следующему алгоритму: 0% – 100% элюента Б, 20 мин; 100% элюента Б, 5 мин; 100% – 0% элюента Б, 2 мин; 0% элюента Б, 3 мин.

Интегрирование пиков хроматограмм проводили в автоматическом режиме, после чего пикам присваивали степень пришивки лекарства к антителу с учетом характерного распределения пиков в хроматографии гидрофобных взаимодействий при разделении ADC несущих ауристатины [365, 366], и рассчитывали взвешенное среднее значение пришивки лекарства к антителу DAR с использованием площади соответствующих пиков в процентах от суммарной площади всех пиков [367].

Электрофорез белков и конъюгатов в полиакриламидном геле.

Для определения ориентировочных молекулярных масс белков проводили электрофорез в условиях, восстанавливающих либо не восстанавливающих тиолы цистеинов белка, которые в физиологических условиях участвуют в образовании дисульфидных связей. В ходе проведения электрофореза в восстанавливающих условиях, белки смешивали с 5-кратным буфером для нанесения образцов на основе додецилсульфата натрия, содержащим 300 мМ дитиотреитола, и проводили инкубацию при 95°C в течение 5 мин (10 мин в отдельных случаях), после чего наносили образцы на гель параллельно с маркерами молекулярного веса белков. Для проведения электрофореза в невосстанавливающих условиях, образцы белков инкубировали в аналогичном буфере для нанесения, но без добавления дитиотреитола, в течение 15 мин с перемешиванием и при комн. т.

Разделение проходило в гелях с содержанием 10% полиакриламида NuPAGE Bis-Tris Mini Protein Gels с использованием системы электрофоретического разделения Mini Gel Tank (оба Thermo Fisher Scientific). Электродный буферный раствор (катодный + анодный) приготовлен в соответствии с протоколом производителя гелей. Гели окрашивали Кумасси синим R-250,

отмывали от несвязавшегося с белком красителя в горячем водном растворе с содержанием 10% этанола и 5% ледяной уксусной кислоты, и проводили детекцию полос белка в геле посредством системы Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, США).

Конъюгация полноразмерного антитела ch14.18 с лекарствами MMAE и MMAF.

Антитело конъюгировали с малеимид-активированными производными ауристатинов MC-VC-PAVC-MMAE или MC-VC-PAVC-MMAF (оба от VOC Sciences, США; далее в работе упомянуты как MMAE и MMAF – за исключением случаев, где особо не оговорено иное) посредством тиольных групп цистеинов, участвующих в формировании дисульфидных связей между цепями антитела. Для этого, сначала проводили полное восстановление межцепочечных цистеинов антитела в ходе инкубации с 1 мМ TCEP в растворе Версена (pH 7.3) в течение 1 ч при 37°C и интенсивном перемешивании. Восстановитель удаляли посредством эксклюзионной хроматографии в центрифужных колонках Zeba Spin Desalting Columns, 7 кДа (Thermo Fisher Scientific). Далее немедленно проводили тиол-малеимидную конъюгацию антитела в концентрации в интервале 1-5 мг/мл с молярным избытком лекарств 7:1 (для конъюгатов со степенью пришивки лекарства к антителу DAR 4) либо 12:1 (DAR 7) в растворе Версена в течение 3 ч при 37°C и интенсивном перемешивании. Наличие EDTA в растворе конъюгации необходимо для хелатирования металлов, которые в противном случае будут способствовать окислению тиольных групп белка [368]. Ауристатины вносили в реакцию в растворе DMSO, при этом содержание DMSO в реакционной смеси не превышало 3%. Реакцию прекращали, удаляя непрореагировавшие MMAE либо MMAF и переводя конъюгаты антител в PBS посредством хроматографии в центрифужных колонках, после чего ADC очищали в колонках еще один раз для гарантии отсутствия в растворе несвязанных с антителом лекарств. Антитело было также конъюгировано с доксорубицином 6-малеимидокапроилгидразоном (альдоксорубицин, ALDOX) и флуоресцеина 6-малеимидом (FAM-малеимид; Lumiprobe, Россия) в условиях реакции (DAR 4), идентичных описанным выше; конъюгацию с производным флуоресцеина проводили в темноте.

Альтернативно, проводили одновременное восстановление цистеинов антитела и реакцию с малеимид-активированными лекарствами в ходе инкубации антитела с 1 мМ TCEP и молярным избытком лекарства 7:1, в растворе Версена в течение 3 ч при 37°C и интенсивном перемешивании, что приводило к получению продукта с более низкой степенью пришивки (DAR 2.8). Подобная одностадийная конъюгация возможна по причине того, что восстановитель TCEP не содержит тиольные группы, и, в отличие от широко используемых восстановителей дитиотреитола и β-меркаптоэтанола, не конкурирует с белком за связывание с малеимидом.

Конъюгация минибоди и scFv-фрагмента с лекарствами MMAE и MMAF.

На первом этапе реакции проводили восстановление С-концевого цистеина, введенного в структуру scFv-фрагмента, а также цистеинов, участвующих в формировании дисульфидных связей между цепями минибоди, посредством инкубации фрагментов антител с 0.5 мМ ТСЕР в растворе Версена (рН 7.3), в течение 1.5 ч при комн. т. и интенсивном перемешивании. Восстановитель удаляли в эксклюзионной хроматографии в колонках Zeba Spin Desalting Columns, 7 кДа, после чего немедленно переходили к конъюгации фрагментов антител в концентрации 1–2 мг/мл в растворе Версена с 4:1 молярным избытком малеимид-активированных ауристатинов MC-VC-PAVC-MMAE или MC-VC-PAVC-MMAF, в течение 3 часов при комн. т. Проведение тиол-малеимидной конъюгации непосредственно после удаления восстановителя особенно важно для scFv-фрагмента с неспаренным С-концевым цистеином, так как задержка между стадиями реакции на полчаса уже приводит к значимому образованию димеров scFv-фрагмента в смеси. Продукты реакций очищали от непрореагировавших ауристатинов и переводили в PBS посредством двукратной эксклюзионной хроматографии в центрифужных колонках. Минибоди и scFv-фрагмент были дополнительно конъюгированы с малеимид-активированным флуоресцеином (FAM-малеимид), в темноте в условиях реакций, идентичных описанным выше.

Получение пегилированных конъюгатов scFv-фрагмента с лекарствами DM1 и DM4.

Конъюгацию scFv-фрагмента с введенным по С-концу белка цистеином и тиол-содержащих производных майтанзина (майтанзиноидов) DM1 или DM4 осуществляли с использованием тетравалентного полиэтиленгликоль-малеимида с молекулярной массой 10 кДа (4arm PEG Maleimide, JenKem Technology, США), далее в работе обозначенного как PEG4. В двух последовательных тиол-малеимидных реакциях к малеимидным группам молекулы PEG4 были конъюгированы лекарство и фрагмент антитела.

В ходе первой тиол-малеимидной реакции, предварительно растворенный в растворе Версена (рН 7.3) PEG4 инкубировали с DM1 либо DM4 в водно-органическом растворе, содержащем 25% раствора Версена и 75% тетрагидрофурана, в течение 2 ч при 37°C и интенсивном перемешивании. Молярное соотношение майтанзиноида к PEG4 в реакциях составляло 12:1. Реакционную смесь лиофилизировали, растворяли в растворе Версена, после чего удаляли непрореагировавший с PEG4 майтанзиноид посредством фильтрации продукта в центрифужных фильтрах Amicon Ultra-4 с размером пор 3 кДа (Merck, Германия). Далее проводили вторую тиол-малеимидную реакцию PEG4-DM1 либо PEG4-DM4 с восстановленным С-концевым цистеином scFv-фрагмента (мягкое восстановление scFv проведено аналогично описанной выше методике) в растворе Версена в течение 16 ч при 4°C, с молярным избытком

scFv-фрагмента к взятому в первую реакцию PEG4 равным 2:1. Продукты реакций были очищены от непрореагировавших с scFv-фрагментом конъюгатов PEG4-DM1 или PEG4-DM4 со средней молекулярной массой чуть более 10 кДа, а также частично очищены от неконъюгированного scFv-фрагмента с массой 27 кДа, посредством фильтров Amicon Ultra-4 с размером пор 30 кДа, и переводились в PBS посредством эксклюзионной хроматографии в колонках Zeba, 7 кДа.

Пегелированный мультимер scFv-фрагмента (scFv-PEG4), не несущий майтанзиноиды, получен в тиол-малеимидной реакции в водном растворе по аналогии с ранее опубликованной методикой [11].

Мечение антител флуорофором для экспериментов *in vivo*.

Мечение ADC, полноразмерных антител и минибоди проводили по аминокетонам лизинов флуоресцентным красителем активированным гидроксисукцинимидным эфиром sulfo-Cyanine5 (sulfo-Cyanine5 NHS-эфир, Lumiprobe, Россия; далее в работе упомянут как Cy5). Белки и их конъюгаты с лекарствами переводили в 0.1 М бикарбонатный буфер pH 8.3 в центрифужных фильтрах Amicon Ultra-4 10 кДа (Thermo Fisher Scientific), после чего добавляли к белку флуорофор в молярном избытке 5:1. Реакции проводили в течение 3 ч в темноте при комн. т. и интенсивном перемешивании, а затем останавливали, удаляя непрореагировавший флуорофор и переводя меченые продукты в PBS в колонках Zeba. Степень пришивки флуорофора Cy5 ко всем молекулам в заданных условиях реакции, рассчитанная с помощью УФ-видимой спектроскопии, была высоко воспроизводима между различными партиями препаратов в интервале 1.8-2 молекулы Cy5 на молекулу белка.

Расчет степени пришивки лекарств и флуорофоров к антителам в УФ-видимой спектроскопии.

Концентрацию белков в растворах определяли по оптическому поглощению на длине волны 280 нм на спектрофотометре BioDrop μ LITE (Biochrom, Великобритания), с использованием их теоретически рассчитанных молекулярных масс. Среднюю степень пришивки лекарств к антителу или фрагменту антитела (DAR) в составе конъюгатов рассчитывали с использованием оптического поглощения конъюгатов на длинах волн соответствующих локальных максимумов поглощения лекарств и длине волны 280 нм – характерном максимуме поглощения белков [369]. Аналогичным образом рассчитана степень пришивки флуорофоров FAM-малеимида и Cy5 в составе флуоресцентно-меченных конъюгатов антител или фрагментов антител.

Использованные при расчете степени пришивки значения коэффициентов экстинкции приведены в **таблице 2.1**. Большинство коэффициентов экстинкции получены экспериментальным путем; спектральные характеристики FAM-малеимида и Cy5 предоставлены их производителем.

Степень пришивки лекарств DM1 и DM4 к scFv в составе пегелированных фрагментов антител с лекарствами scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM1 рассчитана без учета оптического поглощения PEG4, поскольку поглощение полиэтиленгликоля в УФ-видимом диапазоне длин волн пренебрежимо мало. Степень пришивки флуорофора Cy5 к антителу ch14.18 в составе Cy5-меченного конъюгата ch14.18-MMAE рассчитана с допущением, что поглощением MMAE на используемых в расчете длинах волн можно пренебречь.

Таблица 2.1. Коэффициенты экстинкции, использованные для спектрофотометрического анализа степени пришивки лекарств либо флуорофоров к антителам.

Молекула	Коэффициенты экстинкции [см ⁻¹ М ⁻¹]				
	253 нм	256 нм	280 нм	494 нм	646 нм
Антитело ch14.18	84960	93810	205310	4000	4000
Минибоди	64590		129170	2000	2000
scFv-фрагмент	26460		39960	2000	
Ауристин MC-VC-PAVC-MMAE	21920		3220		
Ауристин MC-VC-PAVC-MMAF	21900		2740		
Антрациклин ALDOX		25180	8620		
FAM-малеимид			12580	74000	
sulfo-Cyanine5 NHS-эфир (Cy5)			10840		271000
Майтанзиноид DM1	26820		6560		
Майтанзиноид DM4	21700		5140		

Связывание конъюгатов антител с лекарствами и ганглиозида GD2 в прямом ИФА.

В лунки плоскодонного 96-луночного планшета вносили по 100 мкл раствора ганглиозида GD2 в этаноле в концентрации 0.25 мкг/лунку и сорбировали ганглиозид до полного испарения растворителя в течение 18 часов при 4°C. Забивку сайтов неспецифического связывания осуществляли внося в лунки по 100 мкл раствора 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в буфере PSB-T (PBS с добавлением 0.1% Tween-20 для уменьшения неспецифического связывания в анализе) и проводя инкубацию 2 ч при комн. т. Лунки промывали PBS-T на автоматическом промывателе планшетов. В лунки в трех повторах добавляли разведения GD2-специфичных препаратов в 100 мкл PBS-T, и затем проводили инкубацию в течение 1.5 ч. После еще одной промывки буфером PBS-T, в лунки вносили по 100 мкл раствора вторичных антител и инкубировали в течение 40 мин.

В зависимости от входящих в состав анализируемых конъюгатов антител или фрагментов антител, использовались следующие HRP-меченные вторичные антитела: для полноразмерного

антитела ch14.18, минибоди и их конъюгатов – анти-человеческие Fc-специфичные вторичные антитела (титр 1:6000); для scFv-фрагмента и его конъюгатов (включая пегилированные конъюгаты) – анти-FLAG вторичные антитела (1:6000). Далее лунки два раза отмывали от несвязавшихся антител буфером PBS-T, вносили по 100 мкл проявителя 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific), и проводили ферментативную реакцию 15 минут до развития окрашивания, после чего останавливали реакцию добавлением в лунки по 50 мкл 10% водного раствора H₂SO₄. Оптическое поглощение (OD) продукта реакции измеряли на длине волны $\lambda=450$ нм на спектрофотометре Multiscan FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Методы работы с культурами клеток.

Культивирование клеток.

Клеточные линии мышинных меланом B78-D14 и B16, а также мышинной Т-клеточной лимфомы EL-4 культивировали в среде RPMI-1640, человеческую нейробластому IMR-32 — в среде EMEM, а человеческие нейробластомы NGP-127 и SH-SY5Y, человеческую меланому mS и мышиную меланому M3 — в среде DMEM. Культуральные среды содержали 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки, 100 мкг/мл пенициллина, 100 ЕД/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин. Культивацию клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5%.

Клеточные линии EL-4, B16, IMR-32 и SH-SY5Y получены из Американской коллекции типовых культур. Линии mS, M3 и NGP-127 любезно предоставлены Антоном Буздиным (ИБХ РАН, Россия). Клеточная линия GD2-экспрессирующей мышинной меланомы B78-D14, полученная путем трансфекции GD2-отрицательной линии B16 генами, кодирующими GD3- и GD2-синтазы, любезно предоставлена David Schrama (University Hospital Wuerzburg, Германия). Все линии поддерживались на низком уровне пассажей и регулярно проверялись на наличие микоплазмы методом ПЦР.

МТТ-тест.

Клеточные линии (10⁴ клеток на лунку) инкубировали с последовательными разведениями препаратов в 96-луночных плоскодонных планшетах (Greiner, Австрия) в стандартных условиях в течение 72 ч, после чего проводили оценку жизнеспособности клеток посредством модификации ранее описанной процедуры [370]. Клетки осаждали, удаляли супернатант, после чего добавляли к клеткам по 30 мкл на лунку раствора МТТ в конечной концентрации 250 мкг/мл. Клетки ресуспендировали и инкубировали с МТТ в течение 4 ч. Образовавшиеся кристаллы

формаза на растворяли в 100 мкл DMSO, после чего измеряли оптическую плотность раствора на длине волны 540 нм посредством планшетного спектрофотометра Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific). Ингибирование роста клеток под действием препаратов было нормировано по формуле: $100\% - (A_{\text{обработанные клетки}} - A_{\text{среда}}) / (A_{\text{контроль}} - A_{\text{среда}}) \times 100\%$, где $A_{\text{контроль}}$ – усредненное значение оптической плотности в лунках с интактными клетками, $A_{\text{среда}}$ – в лунках раствора без клеток. Построение дозозависимых кривых и расчет концентраций полумаксимального ингибирования (IC50) по трем репликам репрезентативного эксперимента проводили в программе Graphpad Prism.

Проточная цитофлуориметрия.

Для поверхностного окрашивания культур клеток в суспензии, их переносили из флаконов для культивирования (адгезионные клетки снимали с флаконов раствором Версена с добавлением 0.25% трипсина) в пробирки и два раза отмывали центрифугированием в растворе PBS с добавлением 1% FBS и 0.02% NaN₃. Затем клетки инкубировали с полученными в работе конъюгатами антител и фрагментами антител с малеимид-активированными производными флуоресцеина (FAM-малеимид) и доксорубицина (ALDOX), либо контрольным конъюгатом 14G2a-AF488 (1 мкг конъюгата на образец) в этом же растворе в течение 1 ч. Окрашивание всех клеток проводили при 4°C. Клетки дважды отмывали в PBS, ресуспендировали в PBS и немедленно переходили к анализу. Антиген-связывающие свойства GD2-специфичных конъюгатов антител сравнивали посредством величин относительной интенсивности флуоресценции (relative fluorescence intensity, RFI) – отношения флуоресценции клеток, окрашенных конъюгатом, и аутофлуоресценции неокрашенных клеток.

При окрашивании клеток меланомы B78-D14 пегелированными конъюгатами scFv-фрагмента детекцию проводили посредством введенной в структуру белка FLAG-метки. Окрашивание клеток пегелированными конъюгатами scFv-фрагмента проводили аналогично приведенной выше методике, после чего клетки отмывали в PBS с добавлением 1% FBS и 0.02% NaN₃ и дополнительно инкубировали с вторичными анти-FLAG FITC-мечеными антителами (титр 1:200) в течение 1 ч. Значения RFI в данном эксперименте рассчитаны как отношение флуоресценции клеток, окрашенных соответствующим конъюгатом и вторичными анти-FLAG антителами, и флуоресценции клеток, окрашенных лишь анти-FLAG антителами.

Анализ проводили на проточных цитометрах BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) либо MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Германия). Для каждого образца регистрировали не менее 5000 событий. Данные обрабатывали в программах WinMDI либо FlowJo.

Связывание конъюгатов антител с клетками в конфокальной микроскопии.

Перед окрашиванием во флуоресцентном анализе, по 200 тысяч клеток GD2-положительных (меланома B78-D14, лимфома EL-4) и GD2-отрицательных (меланомы B16 и M3) клеточных линий высевали на стерилизованные покровные стекла (Fisher Scientific, США) и культивировали в полной среде в 6-луночных плоскодонных планшетах для культивирования клеток (Greiner, Австрия) при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 1-2 суток до достижения оптимальной конфлюентности 80%. Затем клетки промывали в PBS и окрашивали конъюгатами GD2-специфичных антител либо фрагментов антител с малеимид-активированным аналогом флуоресцеина (конъюгаты ch14.18-FAM, минибоди-FAM, scFv-FAM либо контрольный конъюгат 14G2a-AF488; 1 мкг на образец) в PBS с добавлением 1% FBS и 0.02% азида натрия, в течение 1 ч при 4°C. Одновременно с этим, клетки окрашивали одним из двух ядерных контрастных красителей DAPI либо Hoechst 33342 (0.5 мкг на образец). Клетки промывали в PBS, фиксировали посредством 4% параформальдегида в течение 30 мин при комн. т., после чего тщательно отмывали в PBS от не связавшегося конъюгата, и помещали в слайды в смоле Mowiol 4–88. Слайды анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа EZ-C1 Eclipse TE2000 (Nikon, Япония), оснащенного объективами Plan Apo 40X и 60X. Изображения получали и обрабатывали в программе EZ-C1 Viewer (Nikon, Япония).

2.4. Методы работы с животными.

Биораспределение антител и их конъюгатов с лекарствами в мышинной модели рака.

Сравнение биораспределения антитела ch14.18 и ADC ch14.18-ММАЕ, а также, в независимом эксперименте, сравнение биораспределения ch14.18 и минибоди проводили *ex vivo* в сингенной мышинной модели GD2-положительной меланомы B78-D14. Для создания модели использовали самок мышей линии C57BL/6 в возрасте 6–8 недель, которые содержались в чистом барьерном помещении в клетках-микроизоляторах. Клетки меланомы отмывали в ходе центрифугирования (10 мин при 800 × g), ресуспендировали в неполной среде RPMI и вводили мышам по 4×10^6 клеток в 150 мкл среды подкожно в правый бок. Полученные инкапсулированные опухоли характеризовались адекватной и воспроизводимой динамикой роста и не метастазировали спонтанно, что делает данную модель подходящей для задач исследования.

Мышей рандомизировали на группы (n = 3 в группе), когда средний объем опухолей достигал 500 мм³, после чего в ретроорбитальный венозный синус вводили по 7.5 мг/кг массы тела (~150 мкг) флуоресцентно-меченных красителем Cy5 конъюгата ch14.18-ММАЕ, антитела ch14.18 или минибоди. Мышей выводили из эксперимента посредством цервикальной

дислокации через 2, 4, 8, 24 или 48 ч после введения препаратов, предварительно мягко усыпив животных изофлураном и ретроорбитально отобрав кровь в пробирки с антикоагулянтом гепарином. Кровь центрифугировали, а супернатант – плазму крови сохраняли при 4 °С для одновременного анализа с органами.

С целью анализа накопления препаратов в тканях с минимальным остаточным содержанием крови, кровь дополнительно удаляли путем транскардиальной перфузии 10-15 мл гепаринизированного PBS до посветления ткани печени до светло-коричневого цвета. Опухоли и органы мышей извлекали, взвешивали, гомогенизировали, и инкубировали в растворе соляной кислоты и этанола (0.3 М HCl, 70% C₂H₅OH в воде) в течение ночи при 4 °С. Образцы центрифугировали, а интенсивность флуоресценции в супернатантах анализировали с помощью флуориметра GloMax-Multi Detection System (Promega, США) с возбуждением при 625 нм и поглощением при 660–720 нм. Органы и плазму крови интактных мышей использовали для вычитания аутофлуоресценции. Результаты представляли в виде процента введенного препарата в грамме ткани (% ID/g). Для оценки содержания препаратов в плазме крови принимали общий объем крови мыши равным 1.5 мл, получаемый объем плазмы из крови равным 55% от объема крови [371], а плотность плазмы равной 1 г/мл.

Анализ противоопухолевой активности ADC и FDC *in vivo*.

Противоопухолевую активность GD2-специфичных ADC и FDC анализировали в нескольких независимых экспериментах в сингенной мышшиной модели меланомы B78-D14. Подкожные опухоли в самках (в одном эксперименте – в самцах) мышей линии C57BL/6 индуцировали аналогично методике, приведенной выше. Терапию начинали при достижении опухолями среднего объема 50 мм³. Мышей рандомизировали на экспериментальные и контрольные группы (n = 4 в группе), после чего все экспериментальные группы получали ретроорбитальные инъекции препаратов в объеме 150 мкл в режиме 5 инъекций с интервалом в 3 дня, а контрольным группам в аналогичном режиме вводили PBS. Препараты были стерилизованы на фильтрах 0.22 мкм перед введением мышам с целью не допустить присутствия взвеси в растворе. Всех животных каждого эксперимента умерщвляли, когда средний объем опухолей контрольной группы эксперимента достигал 1500-2000 мм³. В эксперименте по анализу противоопухолевой активности ADC, фрагменты опухолей после умерщвления мышей помещали в парафиновые блоки, после чего проводили окрашивание гистологических срезов посредством гематоксилина и эозина по стандартной методике.

Объем опухолей мышей в работе измеряли штангенциркулем не менее двух раз в неделю посредством широко используемой [372] модифицированной эллипсоидной формулы $V = (\text{длина} \times \text{ширина}^2) / 2$, где длина и ширина – наибольший и второй по величине перпендикулярные друг

другу линейные размеры опухоли соответственно. В случае некроза ткани опухоли с формированием явной полости в опухоли под действием терапии из объема опухоли вычитали объем сформировавшейся полости (мыши, получавшие ADC ch14.18-MMAE в дозе 10 мг/кг массы тела). Эффективность терапии количественно оценивали посредством коэффициента относительного торможения роста опухолей (ТРО), рассчитываемого по формуле $\text{ТРО (\%)} = (1 - \Delta V_{\text{терапия}} / \Delta V_{\text{контроль}}) \times 100$, где $\Delta V_{\text{терапия}}$ и $\Delta V_{\text{контроль}}$ – изменение среднего объема опухолей в группах терапии и контроля соответственно относительно начала терапии.

Оценка иммуногенной клеточной гибели под действием ADC.

Для эксперимента по вакцинации мышей умирающими клетками, к культуре меланомы B78-D14, которая инкубировалась в стандартных условиях, добавляли ch14.18-MMAE (до конечной концентрации 50 нМ), ch14.18-MMAF (50 нМ), ch14.18-ALDOX (1 мкМ) либо доксорубин (2 мкМ), и проводили инкубацию клеток с препаратами в течение 48 ч. Далее клетки с подложки вместе с супернатантом собирали в пробирки, центрифугировали 20 мин при $800 \times g$, после чего осадок ресуспендировали в неполной среде RPMI и вводили самкам мышей линии C57BL/6 в возрасте 6–8 недель (группы по 5-6 мышей) подкожно в правый бок по 3×10^6 клеток в объеме 150 мкл среды. Группы мышей, которым вводили клетки, пред-обработанные доксорубином либо ch14.18-ALDOX, выступали положительными контролями в эксперименте, поскольку обработка опухолевых клеток лекарствами класса антрациклинов либо ADC на их основе [204, 215] приводят к формированию иммунного ответа хозяина на сингенную опухоль у большинства (типичны цифры порядка 80% [202]) мышей. В качестве неиммуногенного отрицательного контроля группу мышей вакцинировали некротическими клетками, полученными посредством трех циклов быстрого замораживания–оттаивания в жидком азоте. Дополнительной контрольной группой являлись мыши, которые не были вакцинированы клетками опухоли – на этапе вакцинации им подкожно вводили клеточную среду.

Через 7 дней всем животным подкожно в левый бок вводили по 3×10^6 иммунологически наивных живых клеток B78-D14. Введение данного количества живых клеток приводит к формированию опухолей практически у всех мышей в данной опухолевой модели. Для детекции иммуногенности препаратов анализировали процент мышей без опухолей, а также динамику роста опухолей, которые могут развиваться несмотря на индуцированный вакциной адаптивный иммунный ответ [203]. Бока мышей брили каждые две недели с целью тщательного контроля роста опухолей.

2.5. Обработка результатов и статистический анализ.

Графики получены в программах GraphPad Prism либо SigmaPlot. Исключение составляют данные окрашивания клеток в проточной цитофлуориметрии и данные хроматографического анализа, представление которых оговорено в соответствующих разделах. Числовые данные представлены в виде арифметического среднего \pm стандартной ошибки среднего (SEM) как минимум трех независимых экспериментов либо в виде значения одного репрезентативного эксперимента из трех.

Ввиду работы с небольшими выборками, в расчетах принимали нормальное распределение и равные дисперсии выборок. Для сравнения двух независимых групп использовали непарный t-тест Стьюдента. Для множественных сравнений более двух независимых групп между собой использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с post hoc тестами Даннетта либо Тьюки. Метод Каплана-Мейера использован для сравнения доли мышей без опухолей в группах, а статистический анализ кривых данного анализа проводился посредством лог-ранк теста. Уровни значимости $P < 0.05$ принимались статистически достоверными; в работе использованы следующие обозначения уровней значимости: ns, нет значимого отличия между группами; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

3. Результаты и их обсуждение.

3.1. Получение конъюгатов полноразмерного антитела ch14.18 с лекарствами MMAE и MMAF.

3.1.1. Реакции конъюгации и физико-химические свойства ADC.

По данным на начало 2026 года химерное полноразмерное антитело ch14.18 является одним из двух одобренных для клинического применения GD2-специфичных противоопухолевых препаратов. В нашей лаборатории были получены конъюгаты антитела аналогичного ch14.18 с лекарствами класса ауристатинов MMAE и MMAF, конъюгированными к антителу по межпочечным цистеинам тяжелых и легких иммуноглобулиновых цепей, и было показано, что они проявляют селективное цитотоксическое действие в GD2-положительных опухолевых клеточных линиях и противоопухолевую активность в сингенной мышинной модели GD2-положительной лимфомы [9]. В данной работе поставлена задача оптимизировать методику получения и характеристики данных конъюгатов антител с лекарствами (ADC), в частности, оптимизировать соотношение лекарства к антителу в составе конъюгатов с учетом его влияния на стабильность и антиген-связывающие свойства полученных молекул, и провести анализ функциональной активности полученных ADC *in vitro* в опухолевых клеточных линиях с различной экспрессией ганглиозида GD2 и *in vivo* в сингенной мышинной модели GD2-положительной меланомы.

В работу взято антитело ch14.18, полученное посредством экспрессии в клетках китайского хомячка CHO DG44 и очищенное в аффинной хроматографии с использованием иммобилизованного на сефарозе белка G. Ch14.18 представляет собой химерное антитело с человеческими константными доменами (тяжелая гамма-1 цепь и легкая каппа-цепь) и переменными мышинными доменами. Структура антитела изображена на **рисунке 3.1, А**, а аминокислотные последовательности его тяжелой и легкой цепей представлены в **приложении 1**. Чистота и стабильность антитела, использованного в реакциях конъюгации с лекарствами, были подтверждены в полиакриламидном гель-электрофорезе (**рисунок 3.1, Б**) и в эксклюзионной хроматографии (**рисунок 3.1, В**). В ходе визуализации в невозстанавливающем гель-электрофорезе, при проведении которого белки в норме перемещаются по гелю с сохранением всех дисульфидных связей молекулы, антитело ch14.18 наблюдалось в виде одной полосы с молекулярной массой ориентировочно соответствующей теоретически рассчитанной массе 145 кДа, в то время как в восстанавливающих условиях детектировались две полосы ориентировочно соответствующие тяжелой и легкой цепям антитела с рассчитанными молекулярными массами 48 кДа и 24 кДа, соответственно. Как и мышинное антитело 14G2 на основе которого оно было получено, химерное антитело ch14.18 проявляет высокую

специфичность к ганглиозиду GD2 в отсутствии кросс-реактивности к структурно-близким ему ганглиозидам а-серии (GM2 и другие) и b-серии (GD3, GD1b и другие), что было в частности подтверждено в нашей лаборатории [325; 9].

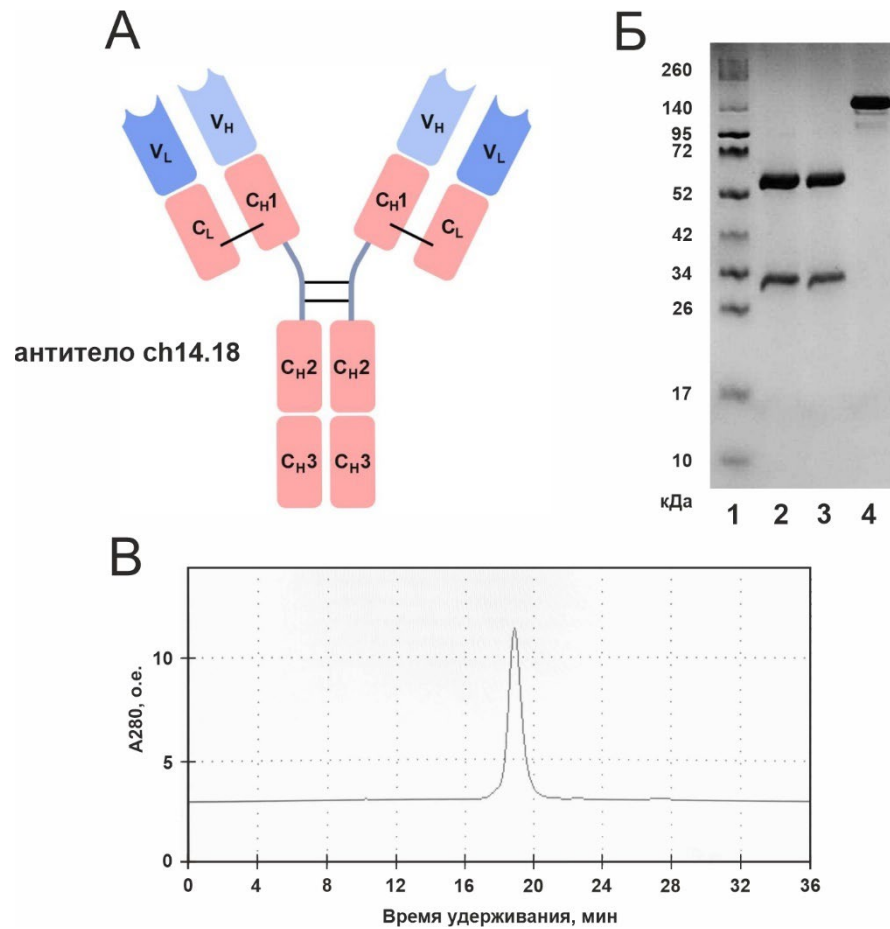


Рисунок 3.1. Структура и визуализация антитела ch14.18. **А.** Структура легкой и тяжелой цепей антитела. V_L и V_H – переменные домены легкой и тяжелой цепей, соответственно; C_L – константный домен легкой цепи; C_{H1} – C_{H3} – константные домены тяжелой цепи; *hinge*-регион – шарнирная область тяжелой цепи. **Б.** Электрофорез в полиакриламидном геле: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 и 3 – ch14.18, восстанавливающие условия; 4 – ch14.18, невосстанавливающие условия. **В.** Эксклюзионная хроматография антитела ch14.18 в нативных условиях, скорость потока 0.75 мл/мин.

Поскольку поставленная в работе задача заключалась в получении клинически значимых GD2-специфичных ADC, для конъюгации к антителу ch14.18 были выбраны лекарства класса ауристатинов монометилауристатин E (MMAE) и F (MMAF), конъюгаты антител с которыми сегодня составляют около трети [6] одобренных для применения в клинике ADC для терапии рака. Аналогичным образом, поскольку все одобренные ADC несущие ауристатины характеризуются степенью пришивки лекарства к антителу (drug-antibody ratio, DAR) в интервале 3.5–4, представлялось важным получить анти-GD2 ADC с сопоставимым DAR для

полученных в оптимизированных условиях реакции, был рассчитан по нескольким образцам и составил 4.4 ± 0.3 для ch14.18-MMAE и 4.1 ± 0.2 для ch14.18-MMAF ($n=5$, представлено как среднее значение \pm SEM). Расчет DAR проводился по данным спектрофотометрического анализа ADC на наблюдаемых максимумах поглощения малеимид-активированных ауристативов (253 нм) и антитела. На **рисунке 3.3, А** представлены спектры поглощения антитела ch14.18 и ADC на основе ch14.18, и можно заметить, что относительное поглощение ориентировочно на 250 нм увеличивается для ADC по сравнению с антителом. Спектры использованных лекарств изображены на **рисунке 3.3, Б**. Кроме того, в идентичных условиях реакции были получены конъюгаты ch14.18 с малеимид-активированными доксорубицином (спектр конъюгата ch14.18-ALDOX представлен на **рисунке 3.3, В**) и флуоресцеином (спектр конъюгата ch14.18-FAM представлен на **рисунке 3.7, Д** в главе 3.2.1). Степень пришивки для ch14.18-ALDOX составила 4.3, а для ch14.18-FAM составила 4.1, что косвенно валидирует методику расчета DAR конъюгатов антитела ch14.18 с лекарствами класса ауристативов.

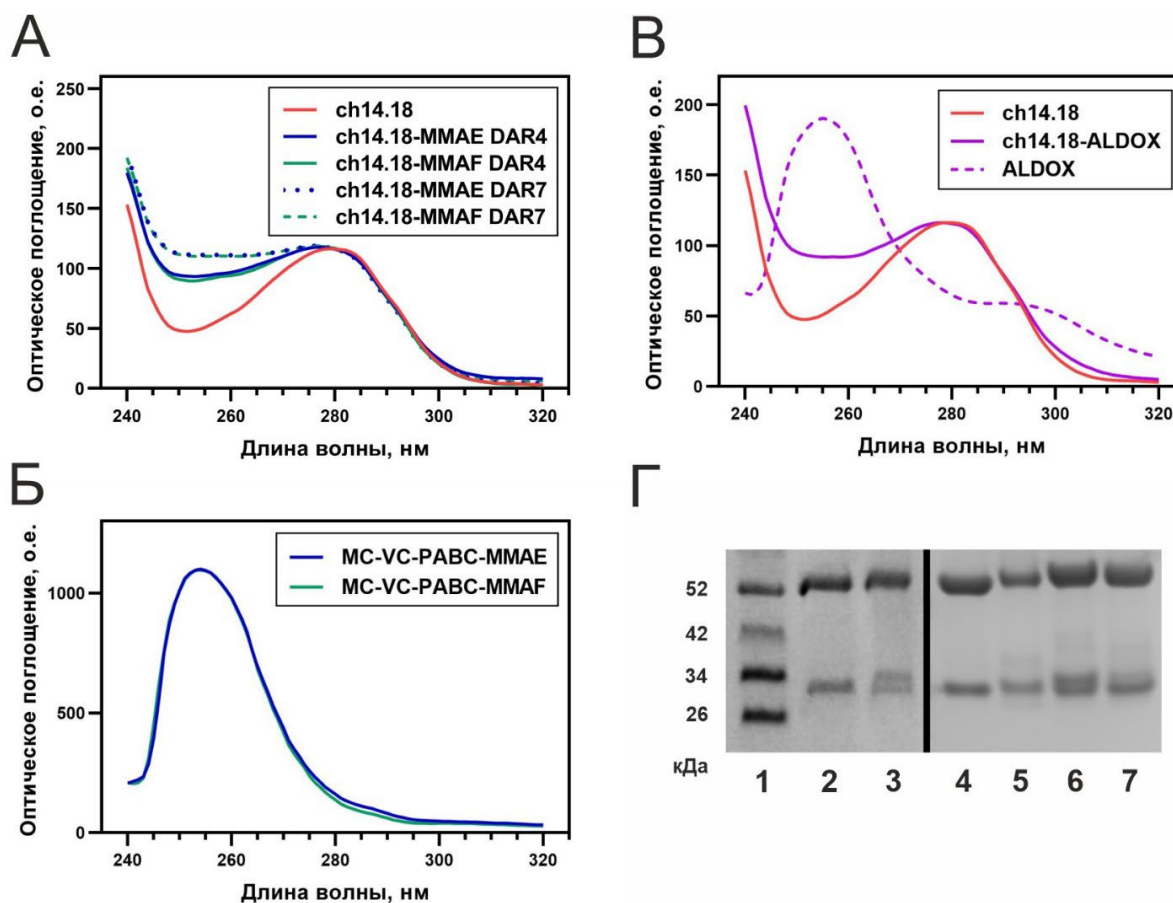


Рисунок 3.3. Физико-химические свойства ADC. А. Спектры ADC и родительского антитела ch14.18, нормированные на длине волны 280 нм. **Б.** Спектры малеимид-активированных ауристативов MMAE и MMAF. **В.** Спектры конъюгата антитела ch14.18 с альдоксорубицином (ch14.18-ALDOX) и антитела ch14.18, нормированные на длине волны 280 нм, а также спектр неконъюгированного альдоксорубицина. **Г.** Электрофорез в полиакриламидном геле 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*.

ADC характеризовались несколько увеличенной молекулярной массой легкой и тяжелой цепей относительно исходного антитела при разделении с помощью гель-электрофореза в восстанавливающих условиях (рисунок 3.3, Г), что указывает на конъюгацию антитела с малеимид-активированными производными MMAE и MMAF (молекулярная масса каждого около 1300 Да). Интересно, что легкая цепь конъюгатов антител с ауристатидами наблюдалась в геле в виде двух близкостоящих полос (ряды 3, 6 и 7 геля), что демонстрирует одновременное присутствие как конъюгированных к лекарству, так и несвязанных с ним цепей.

В целях изучения возможности получить конъюгаты антитела с большей нагрузкой лекарства были также наработаны ADC *ch14.18-MMAE DAR 6.8* и *ch14.18-MMAF DAR 6.7*, спектры которых представлены пунктирными линиями на рисунке 3.3, А. Все перечисленные конъюгаты характеризовались высокой стабильностью в растворе, что в частности подтверждалось тем фактом, что степень пришивки лекарства к антителу для ADC после хранения в течение года при температуре 4°C и последующей очистки от несвязанных низкомолекулярных препаратов в эксклюзионной хроматографии была сравнима со степенью пришивки исходных молекул.

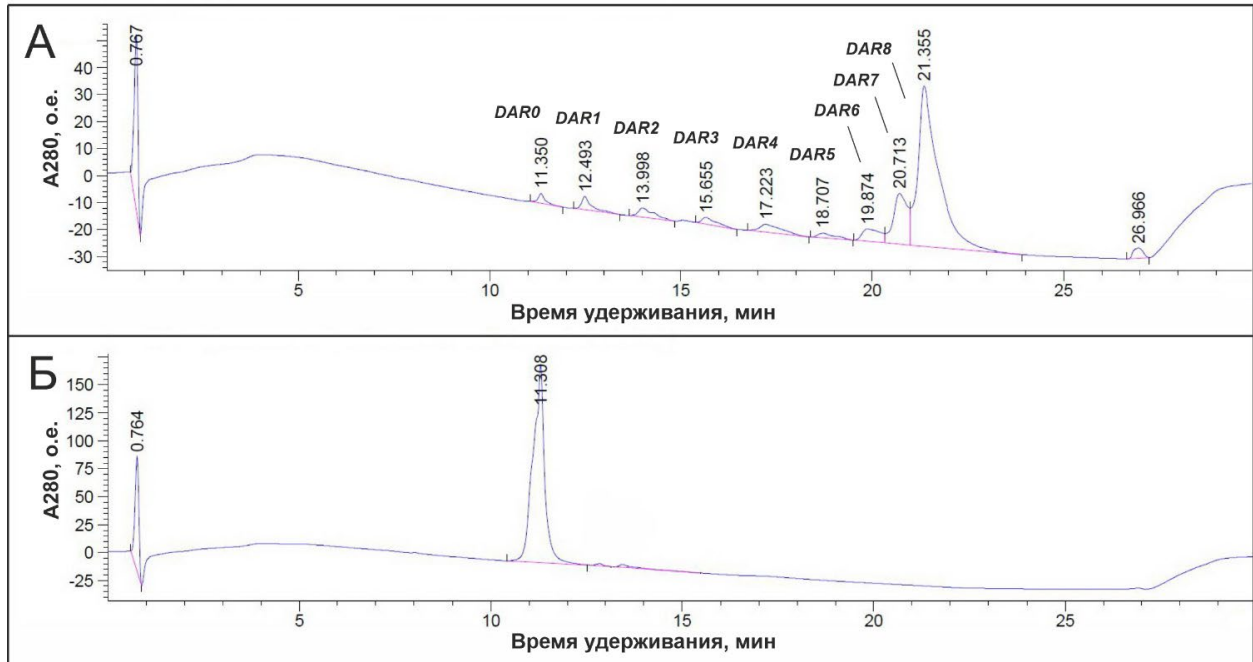


Рисунок 3.4. Анализ степени пришивки лекарства к антителу в хроматографии гидрофобных взаимодействий. А. Хроматограмма конъюгата *ch14.18-MMAE* (DAR 6.8 по данным спектрофотометрического анализа). Б. Хроматограмма антитела *ch14.18*. Хроматограммы представлены в режиме автоматического интегрирования пиков; над каждым пиком указано время удерживания на колонке.

УФ-видимая спектроскопия служила основным методом оценки DAR в работе, но контроль степени пришивки также осуществлялся с помощью альтернативного метода хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC). Ауристатины MMAE и MMAF значительно более гидрофобны в сравнении с антителом, что влияет на их взаимодействие с гидрофобной стационарной фазой в хроматографии. В ходе HIC белки перемещаются по колонке в нативных условиях, и каждый пик в ходе разделения соответствует антителу с возрастающим количеством конъюгированных молекул ауристатинов (DAR 0 – DAR 8).

Хроматограмма конъюгата ch14.18-MMAE (**рисунок 3.4, А**), характеризующегося DAR 6.8 в расчете по данным УФ-видимой спектроскопии, содержала 9 белковых пиков, которым в ходе сравнения с хроматограммой родительского антитела, полученной в идентичных условиях (**рисунок 3.4, Б**), и с характерным распределением пиков для ADC известным по литературе были присвоены степени пришивки от DAR 0 (неконъюгированное антитело ch14.18) до DAR 8. Взвешенное среднее значение DAR конъюгата ch14.18-MMAE, рассчитанное с использованием площадей пиков хроматограммы и соответствующей им лекарственной нагрузки [367], составило 7.0 (расчет DAR представлен в **приложении 2**). В то же время, 67% продукта на хроматограмме детектировалось в виде конъюгата с DAR 8, и только 14% – в виде конъюгата с DAR 7, тогда как содержание неконъюгированного антитела составило 1%. Подобное распределение пиков при хроматографическом разделении демонстрирует гетерогенность ADC, получаемых в ходе сайт-направленной конъюгации лекарств по межцепочечным цистеинам антител – как в случае конъюгатов, полученных в данной работе, так и в случае всех ADC с MMAE либо MMAF, одобренных для клинического применения к началу 2026 года. Тот факт, что конъюгат со средним рассчитанным DAR 7 преимущественно находится в виде ADC с DAR 8, иллюстрирует характерное образование продуктов с четным количеством лекарств при конъюгации по дисульфидным связям, образуемым межцепочечными цистеинами полноразмерных антител [374]. Важно отметить, что ни HIC, ни УФ-видимая спектроскопия по отдельности не позволяют дать точную количественную оценку DAR, а контроль степени пришивки ADC в клинике осуществляется посредством нескольких независимых методов, в частности с использованием хромато-масс спектрометрии ADC в нативных условиях [375, 376].

3.1.2. Антиген-связывающие свойства ADC.

В ходе анализа антиген-связывающих свойств ADC с ганглиозидом GD2 в прямом ИФА все конъюгаты (как со степенью пришивки DAR 4, так и DAR 7) продемонстрировали высокое связывание, которое статистически не отличалось от антитела ch14.18. Результаты связывания последовательных разведений конъюгатов ch14.18-MMAE DAR 4, ch14.18-MMAF DAR 4 и ch14.18-ALDOX DAR 4 с сорбированным на подложке GD2 представлены на **рисунке 3.5, А**.

Конъюгаты антитела ch14.18 эффективно связывались с антигеном на поверхности клеток, что было показано в проточной цитофлуориметрии в ходе окрашивания клеток лимфомы EL-4 с гиперэкспрессией GD2 конъюгатом ch14.18-FAM и параллельно контрольным конъюгатом 14G2a-AF488, для которых были получены сравнимые высокие значения относительной интенсивности флуоресценции (RFI) – 115 и 107, соответственно (рисунок 3.5, Б). Конъюгат антитела с альдоксорубицином, ch14.18-ALDOX, также хорошо окрашивал клетки лимфомы EL-4.

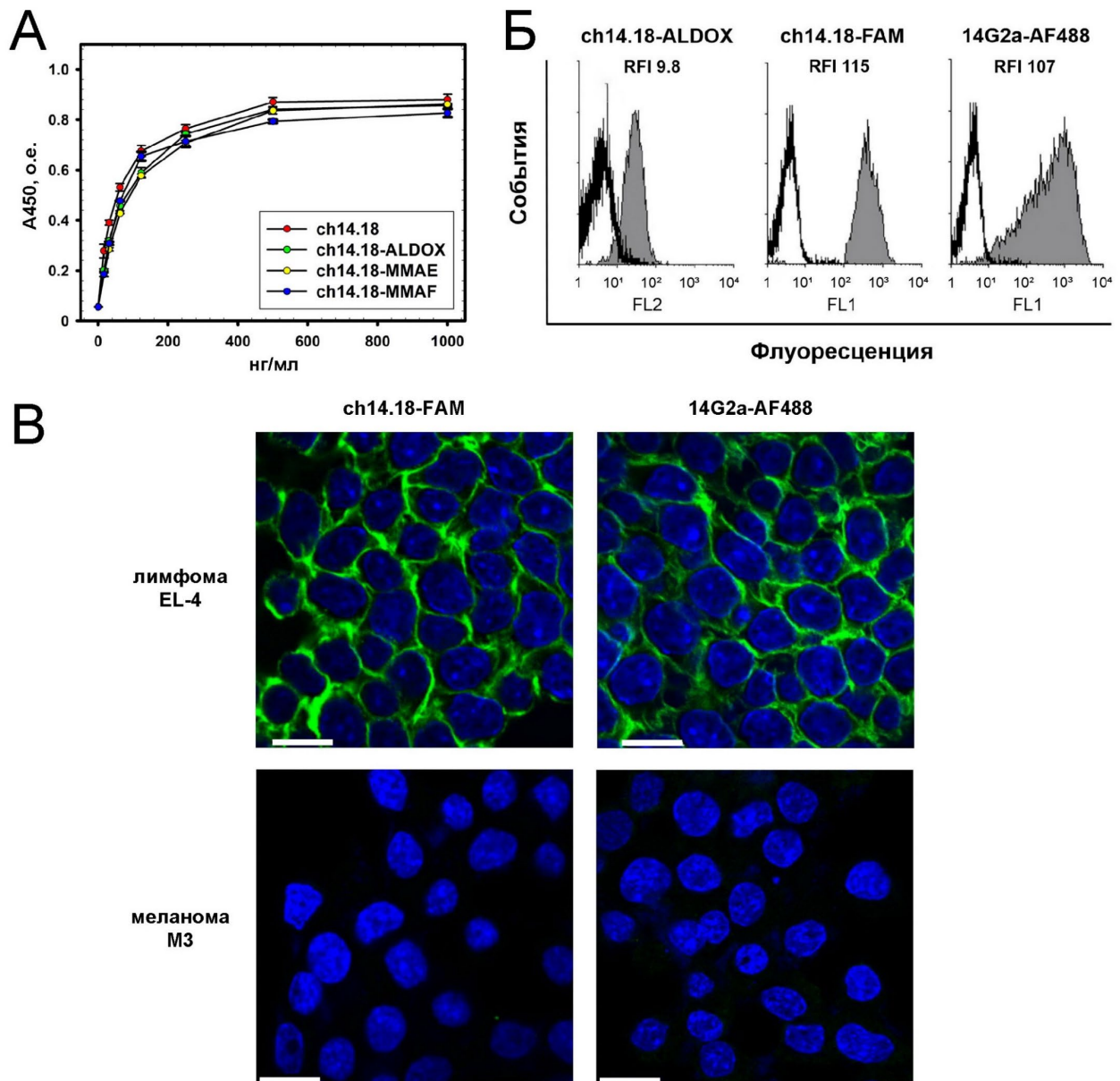


Рисунок 3.5. Антиген-связывающие свойства конъюгатов антитела ch14.18 с лекарствами.
А. Прямой ИФА связывания ADC с сорбированным на подложке ганглиозидом GD2. **Б.** Поверхностное окрашивание клеток GD2-положительной линии лимфомы EL-4 конъюгатами ch14.18-ALDOX, ch14.18-FAM и контрольным конъюгатом 14G2a-AF488 в проточной цитофлуориметрии. Серые гистограммы – окрашивание конъюгатом, пустые гистограммы –

аутофлуоресценция неокрашенных клеток. Показаны значения относительной интенсивности флуоресценции (RFI) – отношения флуоресценции клеток, окрашенных конъюгатом, и аутофлуоресценции неокрашенных клеток. В. Поверхностное окрашивание GD2-положительной линии лимфомы EL-4 и GD2-отрицательной линии меланомы M3 конъюгатами ch14.18-FAM и 14G2a-AF488 в конфокальной микроскопии. Окрашивание анти-GD2 конъюгатами – зеленым цветом, окрашивание ядер клеток красителем DAPI – синим цветом. Отрезок шкалы: 10 мкм.

Специфичное связывание с антигеном было дополнительно подтверждено в конфокальной микроскопии, где ch14.18-FAM и 14G2a-AF488 окрашивали клетки GD2-положительной лимфомы EL-4, но не окрашивали клетки GD2-отрицательной меланомы M3 (**рисунок 3.5, В**). Окрашивание конъюгатом ch14.18-FAM еще одной пары клеток, GD2- отрицательной меланомы B16 и её производной GD2-положительной меланомы B78-D14, представлено на **рисунке 3.9** в **главе 3.2.2**. Результаты указывают на то, что тиол-малеимидная конъюгация использованных лекарств не влияет на антиген-связывающие свойства антитела ch14.18.

3.2. Получение конъюгатов минибоди и scFv с лекарствами MMAE и MMAF.

3.2.1. Реакции конъюгации и физико-химические свойства FDC.

Изменение формата антител в конъюгатах с лекарствами (ADC) на фрагменты антител, с образованием конъюгатов фрагментов антител с лекарствами (FDC), может позволить улучшить терапевтический индекс препарата за счет повышения проникновения в опухоль и снижения системной токсичности. Однако при выборе векторной молекулы для FDC необходимо учитывать ряд критериев [7, 8].

Во-первых, считается, что ключевым параметром, обуславливающим преимущество ряда форматов фрагментов антител в терапии перед полноразмерными антителами, являются их высокая скорость проникновения из кровотока в опухоль и более гомогенное распределение по опухоли. В то же время, эффективное накопление в опухоли в норме требует достаточно длительного времени циркуляции специфичной к опухоли молекулы в организме. Размер молекулы обычно является определяющим фактором для обоих этих параметров, но оказывает на них противоположное влияние: молекулы меньшего размера быстрее проникают в опухоль, но быстрее уходят из циркуляции. Поэтому часто требуется подобрать оптимальный размер фрагмента антитела, который удовлетворял бы обоим параметрам. Во-вторых, поскольку для эффективного действия большинства лекарств необходима их интернализация в клетки-мишени, векторная молекула, используемая для получения конъюгата с лекарствами, должна характеризоваться высоким сродством к антигену и эффективной интернализацией в антиген-

экспрессирующие клетки, а фрагменты антител зачастую характеризуются более низкими в сравнении с IgG антиген-связывающими свойствами. В-третьих, конъюгация молекул лекарства к векторной молекуле (а часто для достижения высокой токсичности требуется конъюгировать к белку несколько молекул лекарства) должна не приводить к нарушению ее стабильности и антиген-связывающих свойств в физиологических условиях. Учитывая, что используемые в составе ADC лекарства, как правило, имеют высокую гидрофобность, эта задача обычно более сложна для фрагментов антител, нежели для IgG, и требует тщательного подбора сайта конъюгации, типа линкера и типа лекарства.

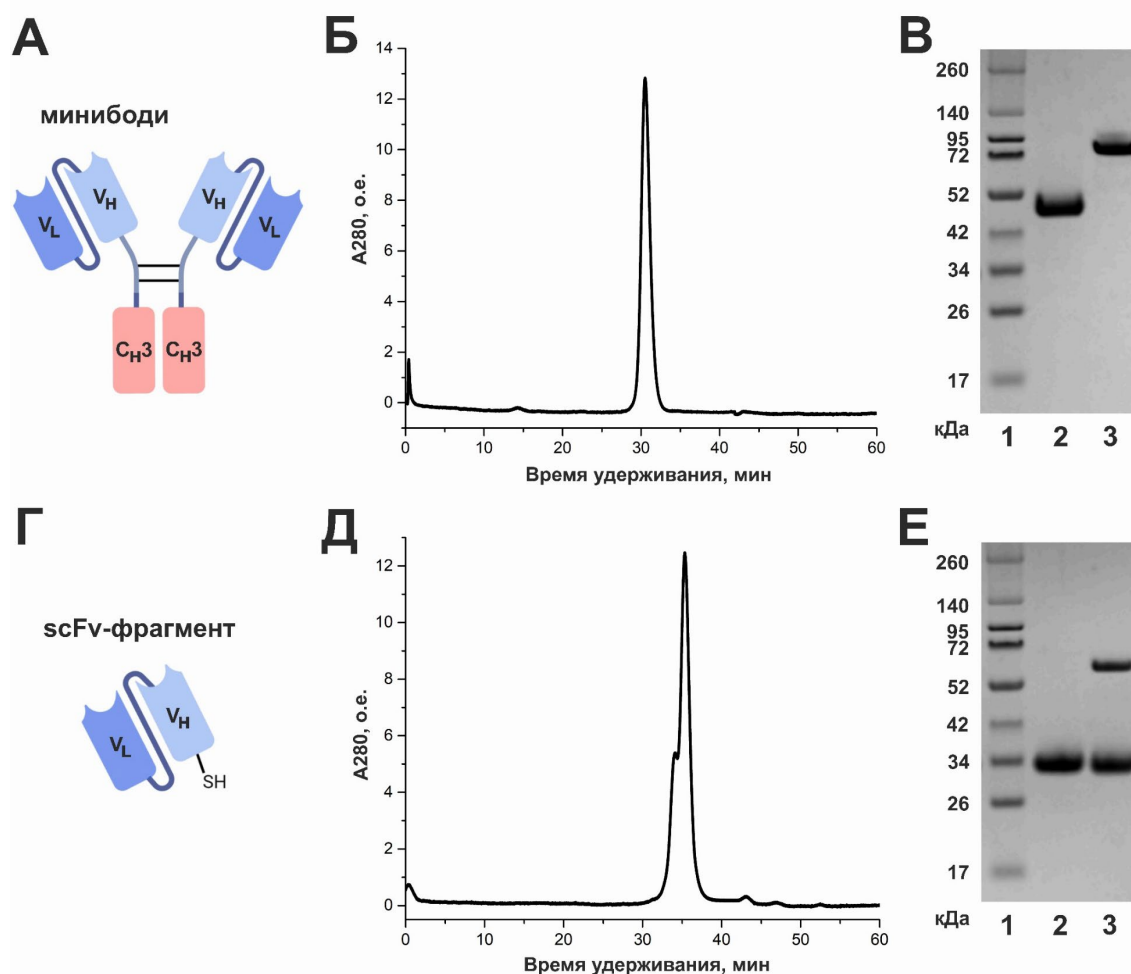


Рисунок 3.6. Структура и визуализация минибоди и $scFv$ -фрагмента. В верхнем ряду представлены (А) структура минибоди, (Б) эксклюзионная хроматография минибоди в нативных условиях, и (В) электрофорез минибоди в полиакриламидном геле. Электрофорез минибоди: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – минибоди, восстанавливающие условия, инкубация при $95^{\circ}C$ в течение 10 мин; 3 – минибоди, невосстанавливающие условия. В нижнем ряду представлены (Г) структура $scFv$ -фрагмента, (Д) эксклюзионная хроматография $scFv$ -фрагмента в нативных условиях, и (Е) электрофорез $scFv$ -фрагмента в полиакриламидном геле. Электрофорез $scFv$ -фрагмента: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – $scFv$,

восстанавливающие условия, инкубация при 95°C в течение 10 мин; 3 – scFv, невосстанавливающие условия. Скорость потока элюента на хроматограммах (Б и Д) – 0.5 мл/мин. V_L и V_H – переменные домены легкой и тяжелой цепей, соответственно; C_{H3} – постоянный домен тяжелой цепи.

В данной работе, для создания FDC использованы два ранее полученных в нашей лаборатории GD2-специфичных фрагмента антитела – минибоди [364] (**рисунок 3.6, А**) и scFv-фрагмент [11] (**рисунок 3.6, Г**), которые несут переменные домены идентичные таковым у антитела *dinutuximab*. Оба белка получены в модифицированной линии клеток HEK-293 и очищены в аффинной хроматографии с использованием иммобилизованного белка L. GD2-специфичное минибоди представляет собой гомодимер, включающий переменные домены антитела в ориентации V_L - V_H , соединенные друг с другом линкером $(G_3S)_4$, а также шарнирный регион IgG1, дополнительный GS-линкер (GGSSGGSG), и постоянный домен C_{H3} антитела *dinutuximab*. GD2-специфичный scFv-фрагмент включает домены V_L - V_H антитела в той же ориентации и соединенные тем же GS-линкером, что и минибоди, а также октапептид FLAG-тэг (для детекции) и неспаренный цистеин на С-конце для сайт-направленной конъюгации с лекарством.

Перед конъюгацией с лекарствами, чистота и стабильность фрагментов антител были проанализированы посредством эксклюзионной хроматографии и полиакриламидного гелевого электрофореза. В ходе анализа в нативных условиях в эксклюзионной хроматографии, минибоди наблюдалось в виде единичного пика (**рисунок 3.6, Б**), время удерживания которого соответствовало литературным данным для данного класса молекул [377]. При разделении в гелевом электрофорезе в невосстанавливающих условиях, минибоди детектировалось в виде полосы, соответствующей его теоретически рассчитанной молекулярной массе 82 кДа [расчет в ProtParam], а в восстанавливающих условиях гомодимер полностью диссоциировал по дисульфидным связям в шарнирном регионе с образованием полосы с наблюдаемой массой 45 кДа (**рисунок 3.6, В**).

Наличие в структуре scFv-фрагмента неспаренного цистеина приводит к тому, что он частично находится в виде димера в нативных условиях. Это подтверждалось тем, что scFv-фрагмент наблюдался в виде двух смежных пиков в ходе анализа в эксклюзионной хроматографии (**рисунок 3.6, Д**). ScFv-фрагмент образовывал две полосы с ориентировочными молекулярными массами 30 и 60 кДа в электрофорезе в невосстанавливающих условиях, а пробоподготовка в восстанавливающих условиях цистеина белка приводила к формированию одной полосы массой 30 кДа (**рисунок 3.6, Е**). Теоретически рассчитанная молекулярная масса scFv-фрагмента равна 27 кДа.

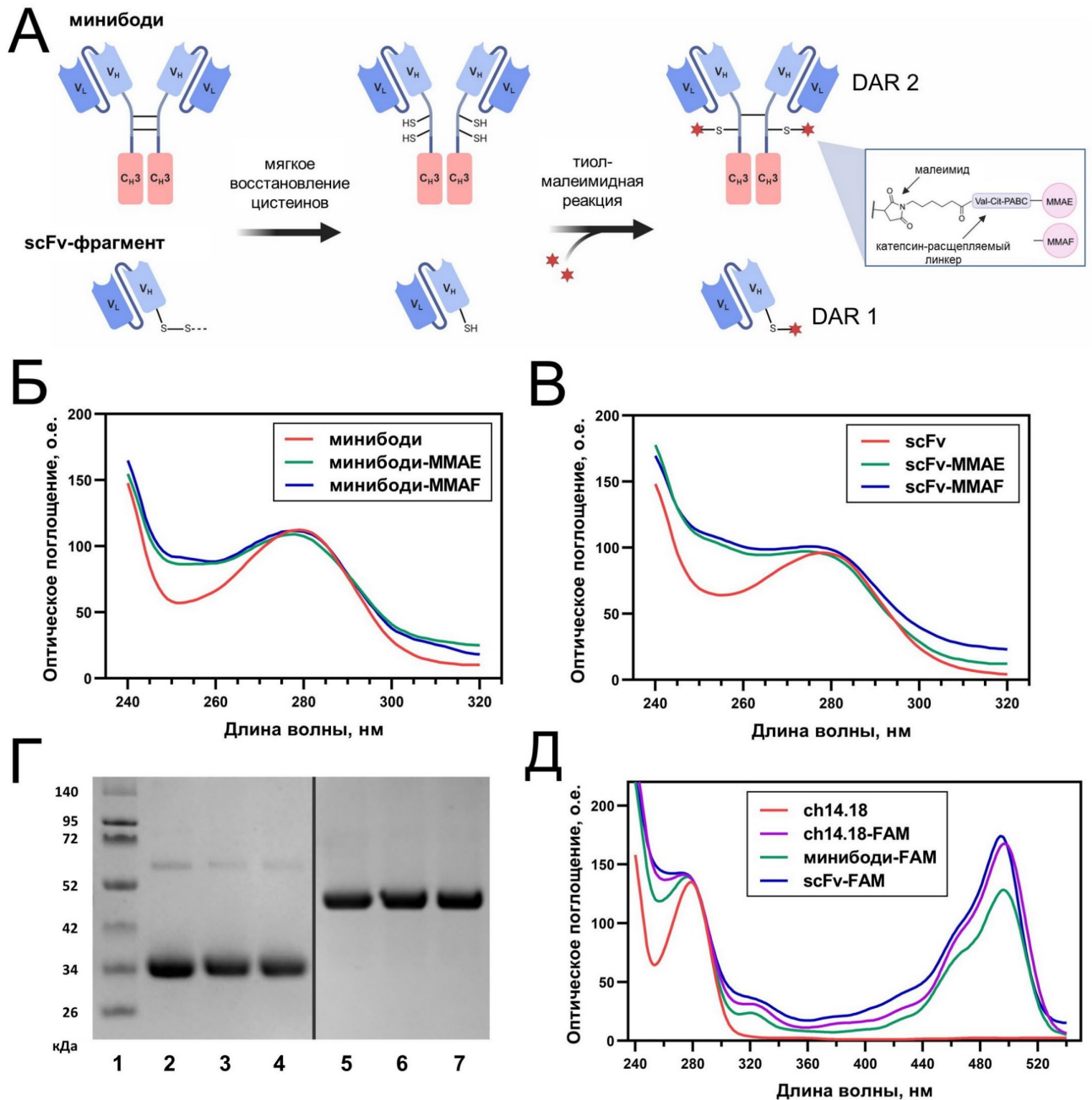


Рисунок 3.7. Получение и физико-химические свойства конъюгатов минибоды и scFv-фрагмента с лекарствами MMAE и MMAF. **А.** Схема реакций получения FDC. **Б.** Спектры конъюгатов минибоды-MMAE, минибоды-MMAF и родительского минибоды, нормированные на длине волны 280 нм. **В.** Спектры конъюгатов scFv-MMAE, scFv-MMAF и родительского scFv-фрагмента, нормированные на длине волны 280 нм. **Г.** Электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях, инкубация при 95°C в течение 5 мин: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – scFv-фрагмент; 3 – scFv-MMAE; 4 – scFv-MMAF; 5 – минибоды; 6 – минибоды-MMAE; 7 – минибоды-MMAF. **Д.** Спектры конъюгатов ch14.18-FAM, минибоды-FAM, scFv-FAM, а также антитела ch14.18, нормированные на длине волны 280 нм.

GD2-специфичные FDC были получены путем конъюгации тех же малеимид-активированных ингибиторов полимеризации тубулина MMAE или MMAF, которые использованы для получения полноразмерных ADC в главе выше, к межцепочечным цистеинам минибоди и к С-концевому цистеину scFv-фрагмента. Схема реакций представлена на **рисунке 3.7, А**. Условия реакций конъюгации минибоди с лекарствами (в первую очередь избыток лекарства) были оптимизированы для получения конъюгатов с наибольшей пришивкой лекарства к антителу (DAR) которая не приводила бы к ухудшению стабильности FDC и оказывала бы незначительное влияние на антиген-связывающие свойства фрагментов антител. Условия реакций конъюгации scFv-фрагмента и лекарств были подобраны таким образом, чтобы обеспечить максимально полную конъюгацию С-концевого цистеина scFv с лекарством для получения пришивки близкой к DAR 1.

В оптимизированных условиях реакций, 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, а степень пришивки для обоих конъюгатов scFv-MMAE и scFv-MMAF составляла $DAR\ 0.9$ с высокой воспроизводимостью между партиями конъюгатов; спектры поглощения конъюгатов минибоди и scFv-фрагмента с лекарствами представлены на **рисунках 3.7, Б и В**, соответственно. Стабильность всех FDC была подтверждена посредством электрофореза в восстанавливающих условиях (**рисунок 3.7, Г**), где не наблюдалось значимой разницы между полосами конъюгатов и соответствующих исходных фрагментов антител.

Также, с целью валидировать методику конъюгации к белкам в составе FDC, в идентичных условиях реакций были получены конъюгаты фрагментов антител с малеимид-активированным флуоресцеином (FAM). Степень пришивки флуорофора в конъюгатах по данным спектрофотометрического анализа (**рисунок 3.7, Д**) составила примерно 0.8 молекул флуорофора на scFv-фрагмент и 1.7 молекул флуорофора на минибоди, что ориентировочно соответствовало DAR для конъюгатов этих фрагментов антител с лекарствами класса ауристатинов.

3.2.2. Антиген-связывающие свойства FDC.

Анализ связывания конъюгатов минибоди и scFv-фрагмента с лекарствами и сорбированного на подложке ганглиозида GD2 в прямом ИФА (**рисунок 3.8, А и Б**, соответственно) показал, что FDC полностью сохраняют антиген-связывающие способности исходных белковых молекул.

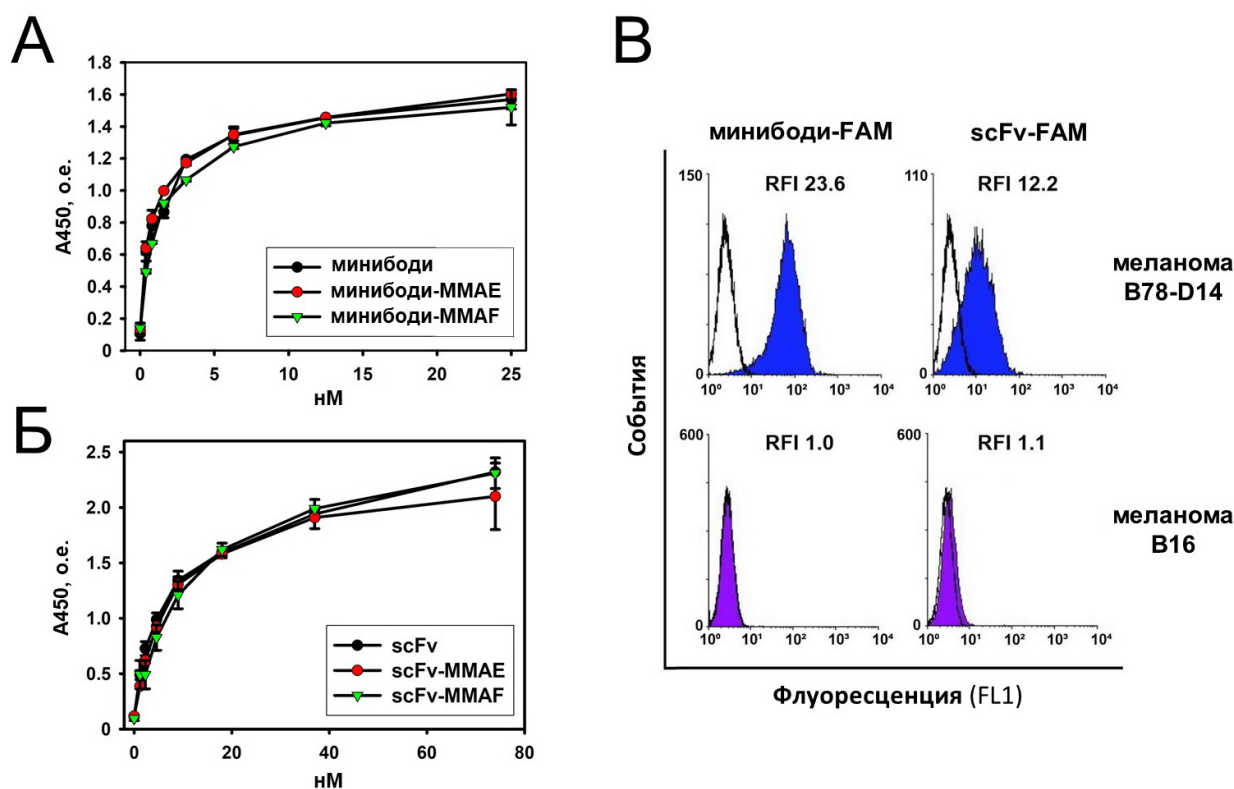


Рисунок 3.8. Антиген-связывающие свойства конъюгатов минибоди и scFv-фрагмента с лекарствами. **А.** Прямой ИФА связывания конъюгатов минибоди с лекарствами и ганглиозида GD2. **Б.** Прямой ИФА связывания конъюгатов scFv-фрагмента с лекарствами и ганглиозида GD2. **В.** Поверхностное окрашивание клеток GD2-положительной линии меланомы B78-D14 и GD2-отрицательной линии меланомы B16 конъюгатами минибоди-FAM и scFv-FAM в проточной цитофлуориметрии. Заполненные гистограммы – окрашивание конъюгатом, пустые – аутофлуоресценция неокрашенных клеток. RFI – относительная интенсивность флуоресценции.

Антиген-связывающие свойства конъюгатов минибоди и scFv-фрагмента с малеимид-активированным флуоресцеином, полученных в условиях реакций, идентичных таковым для конъюгатов с ауристатинами MMAE и MMAF, были проанализированы в линиях GD2-отрицательной меланомы B16 и её производной GD2-положительной меланомы B78-D14 методами проточной цитометрии (**рисунок 3.8, В**) и конфокальной микроскопии (**рисунок 3.9**). Связывание с GD2-положительной, но не с GD2-отрицательной линиями было подтверждено для конъюгатов обоих форматов фрагментов антител, при этом связывание минибоди было значимо выше в сравнении с scFv-фрагментом в обоих методических подходах. Значения относительной интенсивности флуоресценции при окрашивании конъюгатами минибоди-FAM и scFv-FAM меланомы B78-D14 в проточной цитофлуориметрии составили RFI 23.6 и RFI 12.2 соответственно. В эксперимент по окрашиванию клеток в конфокальной микроскопии был

дополнительно взят конъюгат полноразмерного антитела с флуоресцеином, ch14.18-FAM, который также специфично связывал GD2-положительные клетки.

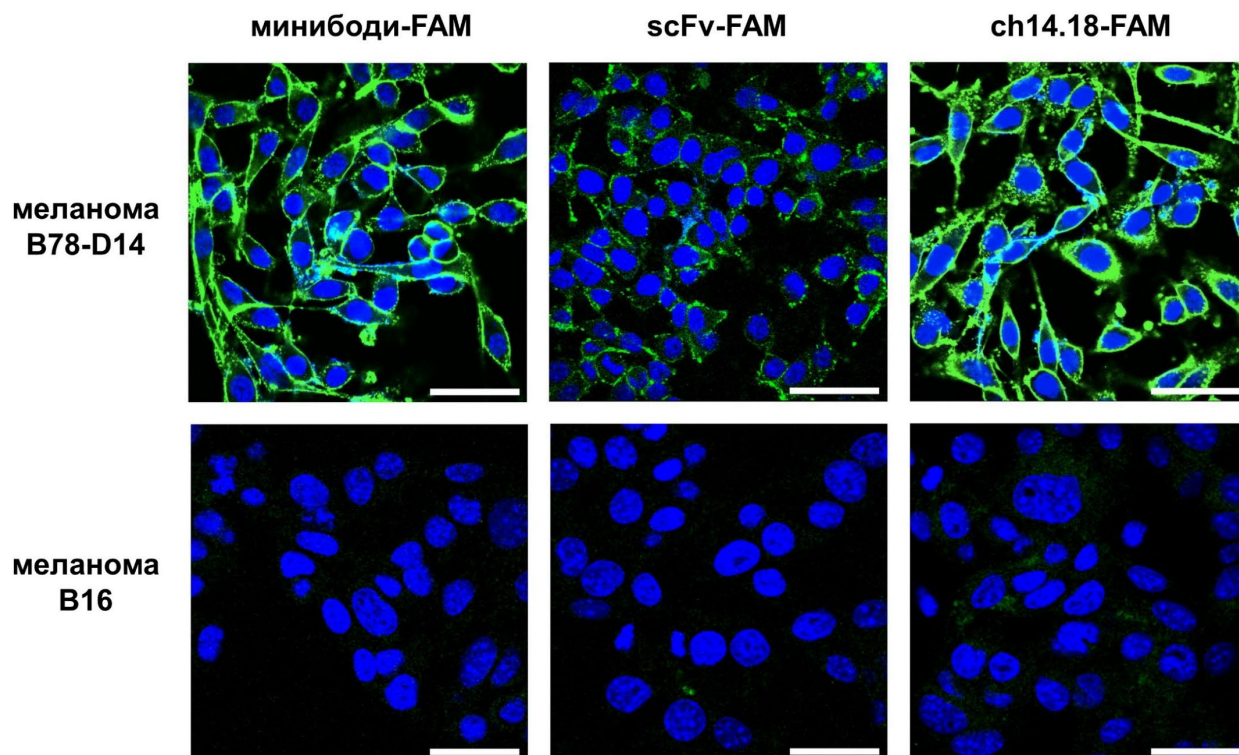


Рисунок 3.9. Поверхностное окрашивание GD2-положительной линии меланомы B78-D14 и GD2-отрицательной линии меланомы B16 конъюгатами минибоди-FAM, scFv-FAM и ch14.18-FAM в конфокальной микроскопии. Окрашивание анти-GD2 конъюгатами – зеленым цветом, окрашивание ядер клеток красителем Hoechst 33342 – синим цветом. Отрезок шкалы: 10 мкм.

3.3. Получение пегилированных конъюгатов scFv с лекарствами DM1 и DM4.

3.3.1. Реакции конъюгации и физико-химические свойства пегилированных FDC.

Конъюгация белков с полиэтиленгликолем (пегилирование) широко используется для улучшения их стабильности и увеличения времени циркуляции *in vivo* [378], что особенно актуально для фрагментов антител, для которых эти параметры обычно сильно уступают полноразмерным антителам. Маскируя поверхность белка и создавая гидрофильную и инертную оболочку вокруг него, пегилирование способно защищать белок от протеолиза и иммунного распознавания, значительно увеличивая при этом его эффективный размер. Одновременно, олигомеризация фрагментов антител посредством молекул ПЭГ может позволить получить конъюгаты, характеризующиеся мультивалентным и, следовательно, более высоким связыванием с целевым антигеном на клетках.

В ранее проведенном в нашей лаборатории исследовании, мультивалентные молекулы ПЭГ, несущие несколько функциональных малеимидных групп, были использованы для создания мультимеров [11] GD2-специфичного scFv-фрагмента антитела (он же применяется для получения FDC в главе 3.2 данной работы). Пегелированные мультимеры scFv-фрагмента характеризовались значительно более высокими антиген-связывающими свойствами, а также временем циркуляции и накоплением в опухоли в мышинной модели рака в сравнении с интактным scFv-фрагментом. В случае мультимера scFv-фрагмента, полученного на основе разветвленного тетравалентного ПЭГ-малеимида с молекулярной массой 10 кДа (использованный ПЭГ далее по работе обозначен как PEG4, а пегелированный мультимер scFv-фрагмента обозначен как scFv-PEG4), содержание препарата в крови мышей через 24 ч после внутривенного введения было как минимум в 5 раз выше, а накопление в опухоли – в 3 раза выше по сравнению с интактным scFv-фрагментом ($p < 0.001$, $n = 5$). В этом же исследовании, конъюгация scFv-фрагмента с моновалентным ПЭГ массой 10 кДа увеличивала время циркуляции белка в крови сильнее, нежели конъюгация с моновалентным ПЭГ массой 5 кДа, подчеркивая влияние размера ПЭГ на улучшение фармакокинетических свойств молекулы. Однако время циркуляции обоих конъюгатов scFv с моновалентными ПЭГ значительно уступало мультимеру scFv-PEG4.

В данной работе, полиэтиленгликоль PEG4 использован для одновременного введения в единую химическую конструкцию вышеупомянутого GD2-специфичного scFv-фрагмента и тиол-содержащих лекарств – майтанзиноидов DM1 либо DM4. Оба лекарства входят в состав одобренных для терапии рака ADC и активно исследуются в разработке новых препаратов, однако производные майтанзина, как и большинство других применяемых в составе ADC лекарств, характеризуются высокой гидрофобностью которая осложняет получение их конъюгатов с антителами и часто приводит к агрегации конъюгатов с высоким DAR. Введение коротких звеньев ПЭГ (обычно 4-24 звеньев) в линкер между антителом и лекарством уже значительно повышает гидрофильность конъюгатов и улучшает их фармакокинетические свойства *in vivo* [245, 379], что подтверждено на примере нескольких клинически одобренных ADC (например, анти-TROP2 sacituzumab govitecan несет лекарство класса аналогов камптотецина, а анти-CD19 loncastuximab tesirine – лекарство класса димеров пирролобензодиазепина), а также показано для конъюгатов антител с майтанзиноидами [380, 381, 382]. Более длинные и разветвленные молекулы ПЭГ (чаще всего в диапазоне молекулярной массы 2-40 кДа) активно применяются для увеличения времени циркуляции и для уменьшения иммуногенности белков в организме [378, 383], а также находят распространение в составе конъюгатов фрагментов антител с лекарствами [384, 385]. По данным на 2026 год, различными регуляторными агентствами одобрено более 30 пегелированных белковых препаратов для

терапии заболеваний человека. Выбор тетравалентного ПЭГ массой 10 кДа в нашей работе призван получить конъюгаты scFv-фрагмента антитела с лекарством с высоким DAR без потери стабильности scFv-фрагмента, а также увеличить его время циркуляции *in vivo*.

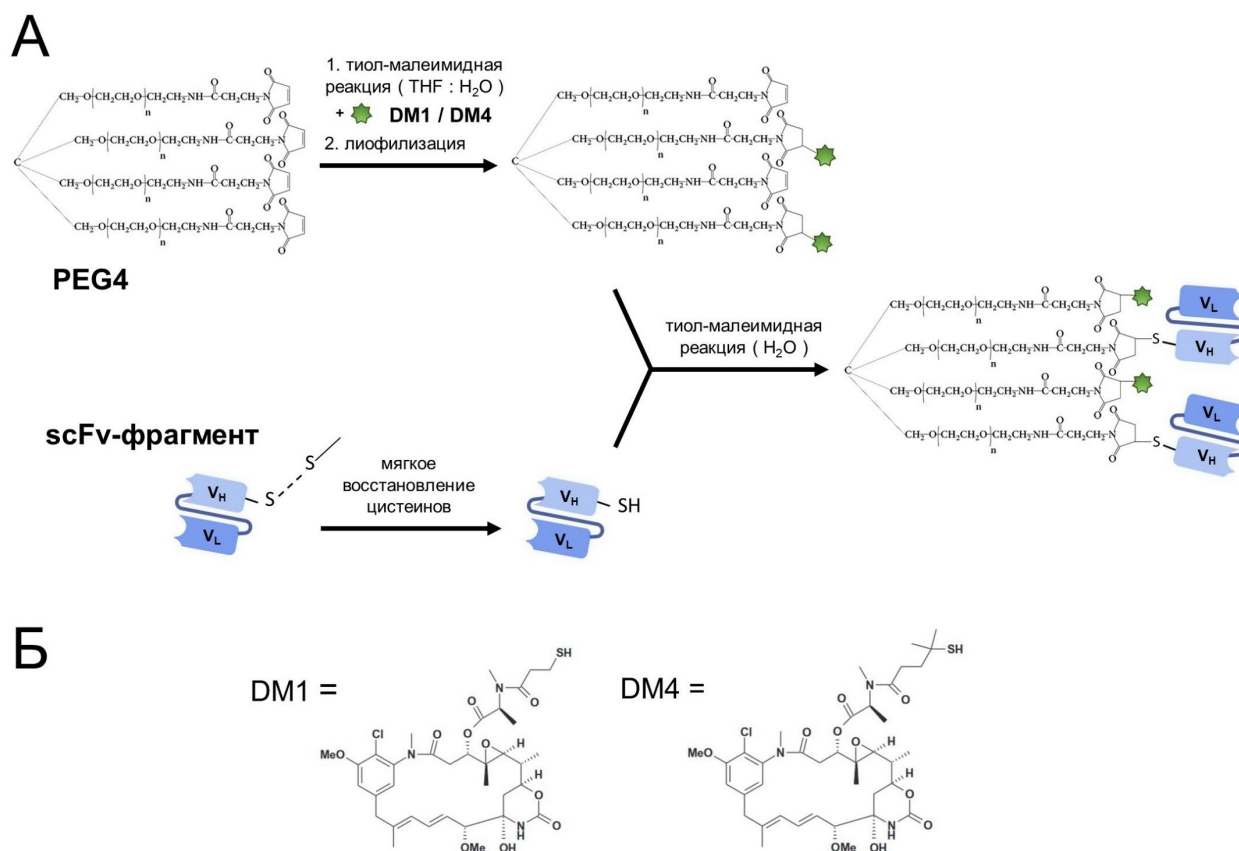


Рисунок 3.10. А. Схема реакций получения пегилированных конъюгатов scFv-фрагмента антитела с лекарствами DM1 и DM4. Б. Структуры майтанзиноидов DM1 и DM4. THF, тетрагидрофуран.

GD2-специфичные пегилированные FDC получены в двухстадийной тиол-малеимидной реакции, схема которой представлена на **рисунке 3.10**. На первой стадии майтанзиноиды DM1 и DM4 были конъюгированы с PEG4 в водно-органической среде, содержащей 75% тетрагидрофурана, и при значительном молярном избытке майтанзиноида к PEG4 в реакции, что привело к связыванию лекарства с большей частью функциональных групп полиэтиленгликоля. Получение конъюгатов посредством двухстадийной реакции обусловлено низкой растворимостью майтанзиноидов в водных растворах, а также использованием схожих методик при конъюгации майтанзиноидов с ПЭГ-содержащими линкерами при получении конъюгатов полноразмерных антител с высокой нагрузкой лекарством [380, 386]. На второй стадии PEG4-DM1 и PEG4-DM4 были конъюгированы с восстановленным концевым цистеином GD2-специфичного scFv-фрагмента, уже в отсутствие органического растворителя. Наконец, в ходе очистки пегилированных FDC на фильтрах с порогом фильтрации 30 кДа, а также в

экслюзионной хроматографии, из раствора были удалены непрореагировавшие с фрагментом антитела PEG4-DM1 и PEG4-DM4, молекулярная масса которых значительно ниже порога фильтрации. Данная стратегия также позволила частично очистить продукты от непрореагировавшего scFv-фрагмента массой 27 кДа.

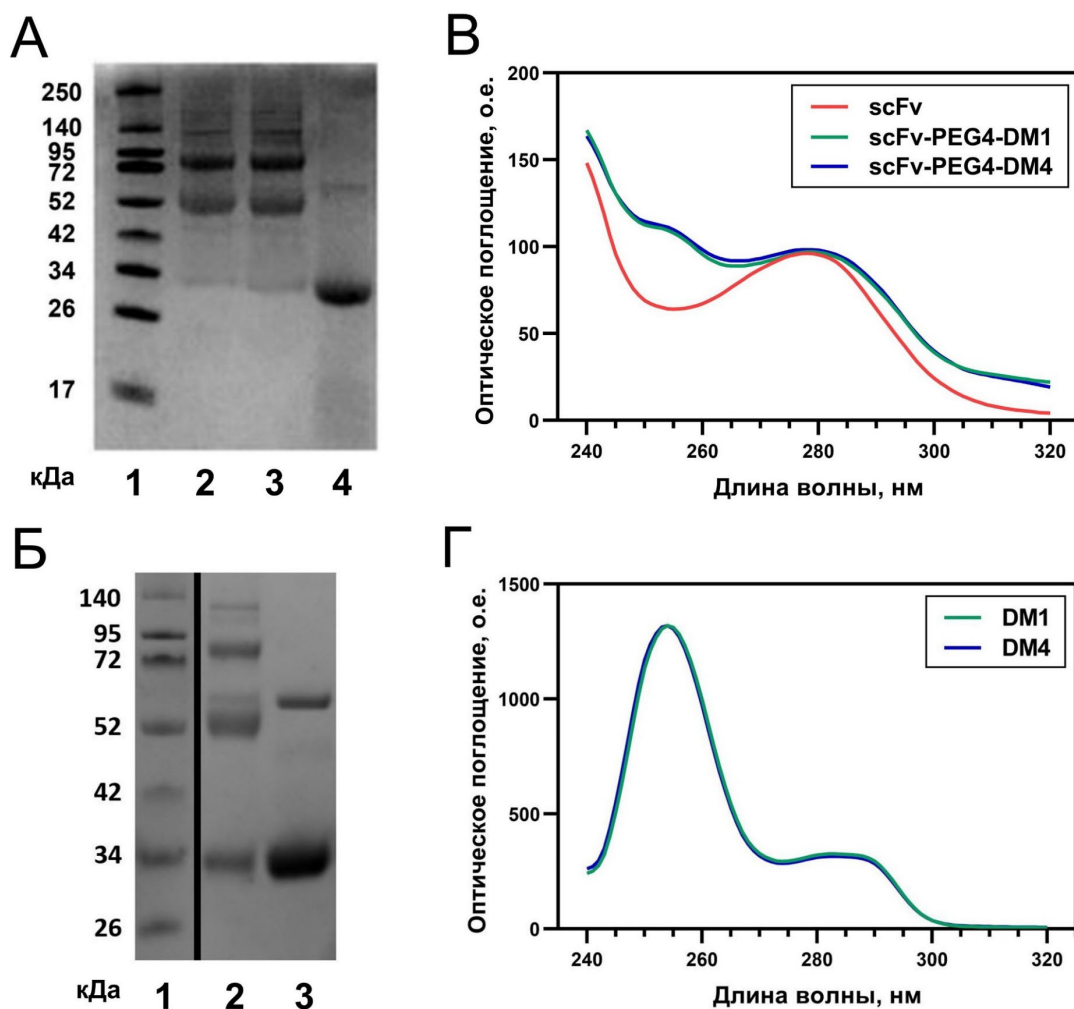


Рисунок 3.11. Физико-химические свойства пегилированных конъюгатов scFv-фрагмента антитела с лекарствами DM1 и DM4. **А.** Электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – scFv-PEG4-DM1; 3 – scFv-PEG4-DM4; 4 – scFv-фрагмент. **Б.** Электрофорез в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – scFv-PEG4-DM4, реакционная смесь до очистки; 3 – scFv-фрагмент. **В.** Спектры конъюгатов scFv-PEG4-DM1, scFv-PEG4-DM4 и родительского scFv-фрагмента, нормированные на длине волны 280 нм. **Г.** Спектры майтанзиноидов DM1 и DM4.

Белковые продукты реакций анализировали посредством полиакриламидного геле-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 было невелико (**рисунок 3.11, А** – ряд 2, scFv-PEG4-DM1; ряд 3, scFv-PEG4-DM4). Важно отметить, что пегилированные белки демонстрируют аномальную электрофоретическую подвижность в геле по сравнению с немодифицированными белками аналогичной молекулярной массы, что обусловлено повышенным гидродинамическим радиусом (R_h) модифицированной молекулы – эффективным радиусом сферы, которую молекула занимает в растворе при учете ее взаимодействия с растворителем [387, 388]. Так, на **рисунке 3.11, Б** показаны результаты электрофореза в восстанавливающих условиях для продукта реакции scFv-PEG4-DM4 перед комплексной очисткой от непрореагировавших компонентов реакции (**ряд 2**) и отдельно для scFv-фрагмента (**ряд 3**). Пробоподготовка в восстанавливающих условиях приводит к тому, что scFv-фрагмент с неспаренным концевым цистеином частично перемещается по гелю в виде димера с теоретической молекулярной массой 54 кДа, и в то же время полоса пегилированного мономера scFv-фрагмента с теоретической массой 37 кДа наблюдается в геле в ряду 2 непосредственно под полосой димера scFv-фрагмента.

Степень пришивки майтанзиноидов к PEG4 в продуктах реакций конъюгации детектировали посредством спектрофотометрического анализа на длине волны наблюдаемого максимума поглощения лекарств (253 нм). Спектры scFv-PEG4-DM1, scFv-PEG4-DM4 и родительского scFv-фрагмента представлены на **рисунке 3.11, В**, а спектры свободных майтанзиноидов – на **рисунке 3.11, Г**. Поглощение полиэтиленгликоля в анализируемом диапазоне длин волн пренебрежимо мало. Соотношение DM1 и DM4 к мономеру scFv в продуктах реакций составило 1.5 ± 0.2 и 1.6 ± 0.3 соответственно (среднее \pm SEM между $n=3$ партиями). 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 всё лекарство находится в составе конъюгата с scFv-фрагментом. Совокупные данные гель-электрофореза и спектрофотометрического анализа пегилированных FDC позволяют дать приблизительную оценку их составу. Из того, что продукты конъюгации преимущественно находятся в виде пегилированных мономеров и пегилированных димеров scFv-фрагмента, а соотношение лекарства к мономеру scFv-фрагмента в них составляет 1.5, следует, что 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.

3.3.2. Антиген-связывающие свойства пегилированных FDC.

Анализ связывания конъюгатов scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 с сорбированным ганглиозидом GD2 и GD2-экспрессирующими клетками был проведен посредством прямого ИФА и поверхностного окрашивания опухолевых клеток в проточной цитофлуориметрии соответственно.

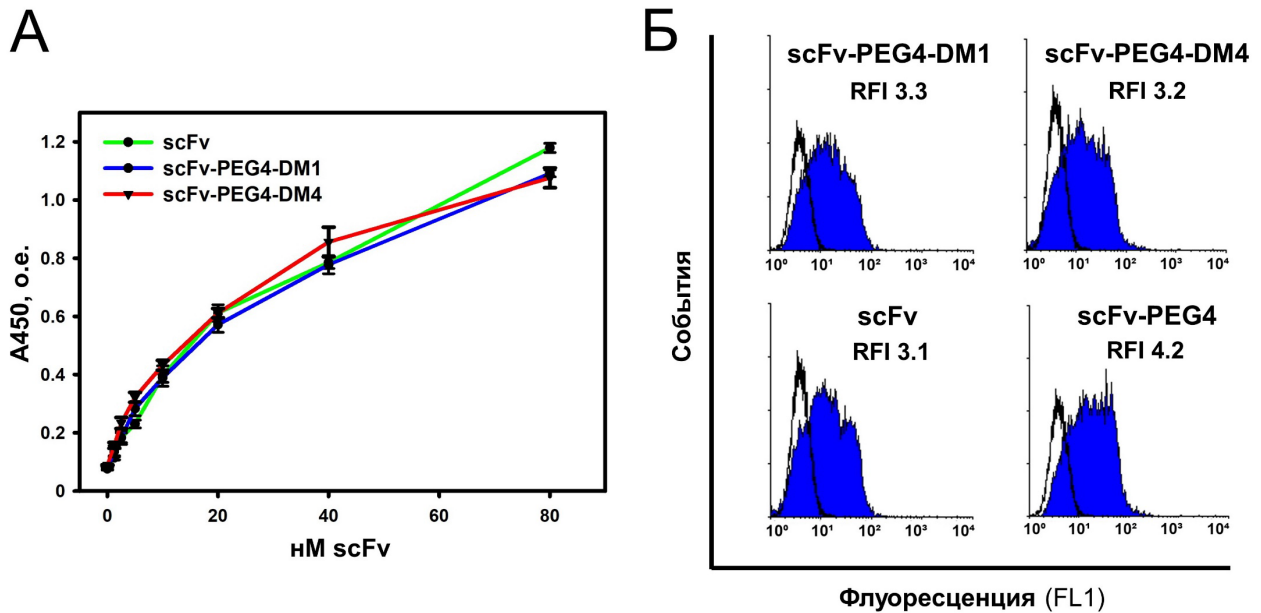


Рисунок 3.12. Антиген-связывающие свойства пегилированных конъюгатов scFv-фрагмента антитела с лекарствами DM1 и DM4. **А.** Прямой ИФА связывания конъюгатов scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 с сорбированным на подложке ганглиозидом GD2. **Б.** Поверхностное окрашивание клеток GD2-положительной линии меланомы B78-D14 конъюгатами scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4, а также scFv-фрагментом и его пегилированным мультимером scFv-PEG4 в проточной цитофлуориметрии. Детекцию в ИФА и проточной цитофлуориметрии проводили по введенной в структуру scFv FLAG-метке. Заполненные гистограммы – флуоресценция при окрашивании конъюгатами; пустые гистограммы – флуоресценция клеток, инкубированных лишь с вторичным анти-FLAG FITC-меченым антителом. Показаны значения относительной интенсивности флуоресценции (RFI) – отношения флуоресценции клеток, окрашенных конъюгатом, и флуоресценции клеток, инкубированных лишь с вторичным антителом.

Сравнение антиген-связывающих свойств пегилированных FDC и родительского scFv-фрагмента в ИФА проводили из расчета на молярную концентрацию scFv в составе конъюгатов, а детекцию проводили посредством анти-FLAG HRP-меченных антител. Зависимости оптической плотности от концентрации исследуемых образцов показали, что конъюгация не оказывает влияния на способность scFv-фрагмента связывать GD2 (рисунок 3.12, А). Данный

результат был в целом ожидаем, поскольку ранее полученный [11] на основе полиэтиленгликоля PEG4 мультимер этого же GD2-специфичного scFv-фрагмента (scFv-PEG4), несущий в среднем более двух антиген-связывающих фрагментов, демонстрировал значительно более высокое связывание с GD2 в сравнении со свободным scFv как в прямом, так и в конкурентном ИФА.

Для окрашивания в проточной цитофлуориметрии использовали линию клеток меланомы B78-D14 с гиперэкспрессией GD2. Окрашивание клеток пегелированными FDC было проведено в сравнении с интактным scFv-фрагментом и пегелированным мультимером scFv-фрагмента (scFv-PEG4), с последующей детекцией посредством вторичных анти-FLAG антител (**рисунок 3.12, Б**). ScFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 связывались с клетками на уровне, сопоставимом с интактным scFv-фрагментом, о чем говорят сравнимые значения относительной интенсивности флуоресценции (RFI) при их инкубации с клетками. В то же время, мультимер scFv-PEG4 ожидаемо связывался с клетками несколько сильнее. Таким образом, в двух методических подходах было показано, что GD2-специфичные пегелированные FDC характеризуются как минимум не уступающими родительскому scFv-фрагменту антиген-связывающими свойствами.

3.4. Подбор клеточных моделей для анализа GD2-специфичных молекул.

Поскольку эффективность GD2-специфичной терапии в норме коррелирует с уровнем экспрессии антигена на поверхности опухолевых клеток, в анализ цитотоксических эффектов были взяты опухолевые клеточные линии с различной экспрессией ганглиозида GD2. В качестве ключевой пары клеточных линий для анализа эффектов ADC и FDC *in vitro* были выбраны мышинные меланомы B78-D14 и B16. Основная причина выбора данной пары линий заключается в том, что меланома B78-D14 является производной GD2-отрицательной меланомы B16, модифицированной генами синтаз GM2/GD2 и GD3 [389], и поэтому отличается от B16 в первую очередь конститутивной экспрессией ганглиозида GD2, что делает эти линии адекватной парой для сравнения цитотоксических эффектов GD2-специфичных препаратов.

Панель опухолевых линий, использованная для анализа цитотоксических эффектов ADC, включала меланомы B78-D14, mS, B16 и M3, нейробластомы IMR-32, SH-SY5Y и NGP-127, а также Т-клеточную лимфому EL-4. Аргументами в пользу выбора такой панели опухолевых линий послужили необходимость сравнить эффекты полученных конъюгатов в линиях нескольких типов рака с высокой и низкой/гетерогенной экспрессией GD2, а также провести анализ как в человеческих, так и в мышинных линиях. Анализ экспрессии GD2 проводили посредством полученного в работе конъюгата ch14.18-FAM, который окрашивал GD2-положительные опухолевые клетки сравнимо с коммерческим GD2-специфичным конъюгатом антитела с флуорофором 14G2a-AF488 (см. **рисунок 3.5, Б и В** в главе 3.1.2). Конъюгат 14G2a-

AF488 ранее уже использовался в нашей лаборатории для характеристики ряда клеточных линий по экспрессии ганглиозида GD2, где, в частности, была показана высокая экспрессия GD2 в линиях человеческих нейробластомы IMR-32 и меланомы mS, а также мышинной лимфомы EL-4 [325].

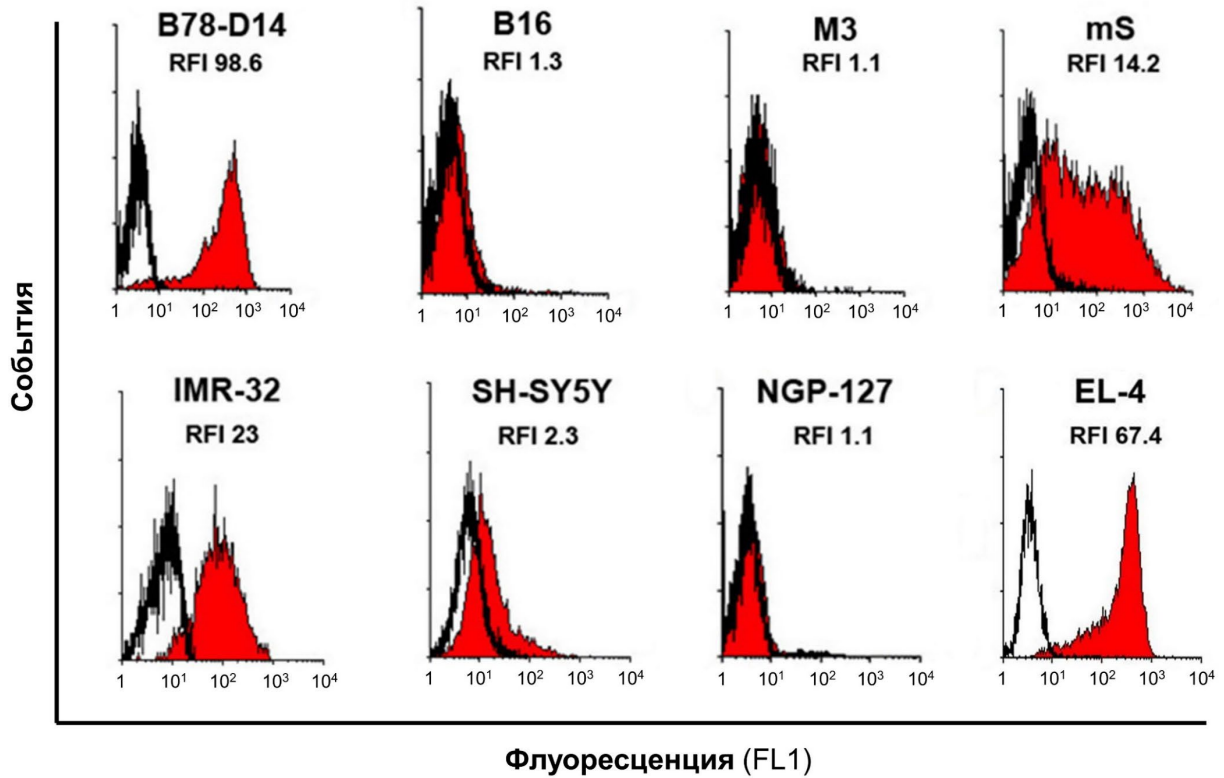


Рисунок 3.13. Поверхностное окрашивание опухолевых клеточных линий GD2-специфичным конъюгатом *ch14.18-FAM* в проточной цитофлуориметрии. Красные гистограммы – окрашивание конъюгатом, пустые гистограммы – аутофлуоресценция неокрашенных клеток. Показаны значения относительной интенсивности флуоресценции (RFI) - отношение флуоресценции клеток, окрашенных конъюгатом, и аутофлуоресценции неокрашенных клеток.

Взятые в анализ клеточные линии были охарактеризованы в соответствии с относительной интенсивностью флуоресценции (RFI) по результатам поверхностного окрашивания в проточной цитофлуориметрии (**рисунок 3.13**) как линии с гиперэкспрессией GD2 (B78-D14, EL-4), с высокой экспрессией (IMR-32, mS), низкой экспрессией (SH-SY5Y), и не экспрессирующие GD2 (B16, NGP-127, M3). Список линий вместе с RFI репрезентативных экспериментов по окрашиванию анти-GD2 конъюгатом дополнительно представлен в **таблице 3.1**.

Таблица 3.1. Уровень экспрессии ганглиозида GD2 в панели опухолевых клеточных линиях, использованных в работе. Ч – человек, М – мышь.

Тип опухоли	Клеточные линии	Происхождение	RFI	Уровень экспрессии GD2
нейробластома	IMR-32	Ч	23	++
	SH-SY5Y	Ч	2.3	+
	NGP-127	Ч	1.1	-
меланома	B78-D14	М	98.6	+++
	mS	Ч	14.2	++
	B16	М	1.3	-
	M3	М	1.1	-
лимфома	EL-4	М	67.4	+++

3.5. Цитотоксическая активность GD2-специфичных конъюгатов в опухолевых клеточных линиях.

3.5.1. Конъюгаты антитела ch14.18 с лекарствами MMAE и MMAF.

Цитотоксические эффекты конъюгатов ch14.18-MMAE и ch.14.18-MMAF со степенью пришивки лекарства DAR 4 были проанализированы в панели клеточных линий с различной экспрессией GD2 посредством МТТ-теста, который позволяет оценить уровень активности митохондрий клеток, и, опосредованно, жизнеспособность клеток. Оба конъюгата с высокой эффективностью ингибировали жизнеспособность мышинных меланомы B78-D14 и лимфомы EL-4, гиперэкспрессирующих ганглиозид GD2 (**рисунок 3.14, А и Б**). Первоначально выбранный наномолярный диапазон концентраций не позволил достоверно определить концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для ADC в линиях B78-D14 и EL-4, поэтому анализ цитотоксических эффектов конъюгатов в этих линиях был также проведен для более низкого пикомолярного диапазона концентраций (**рисунок 3.14, В и Г**). Значения 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 сравнения цитотоксических эффектов ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF в клеточных линиях меланомы с гиперэкспрессией (линия B78-D14), высокой экспрессией (линия mS) либо без экспрессии (линии B16 и M3) ганглиозида GD2, наблюдалась прямая зависимость эффектов обоих ADC от уровня антигена на клетках (**рисунок 3.14, А и Б**). Цитотоксические эффекты конъюгатов были минимальны в линиях меланом B16 и M3, не экспрессирующих GD2, даже при

высоких концентрациях. Здесь важно повторно отметить, что клеточная линия меланомы B78-D14 является производной линии B16, что означает, что данные линии практически идентичны генетически и представляют адекватную пару для сравнения функциональной активности GD2-специфичных препаратов.

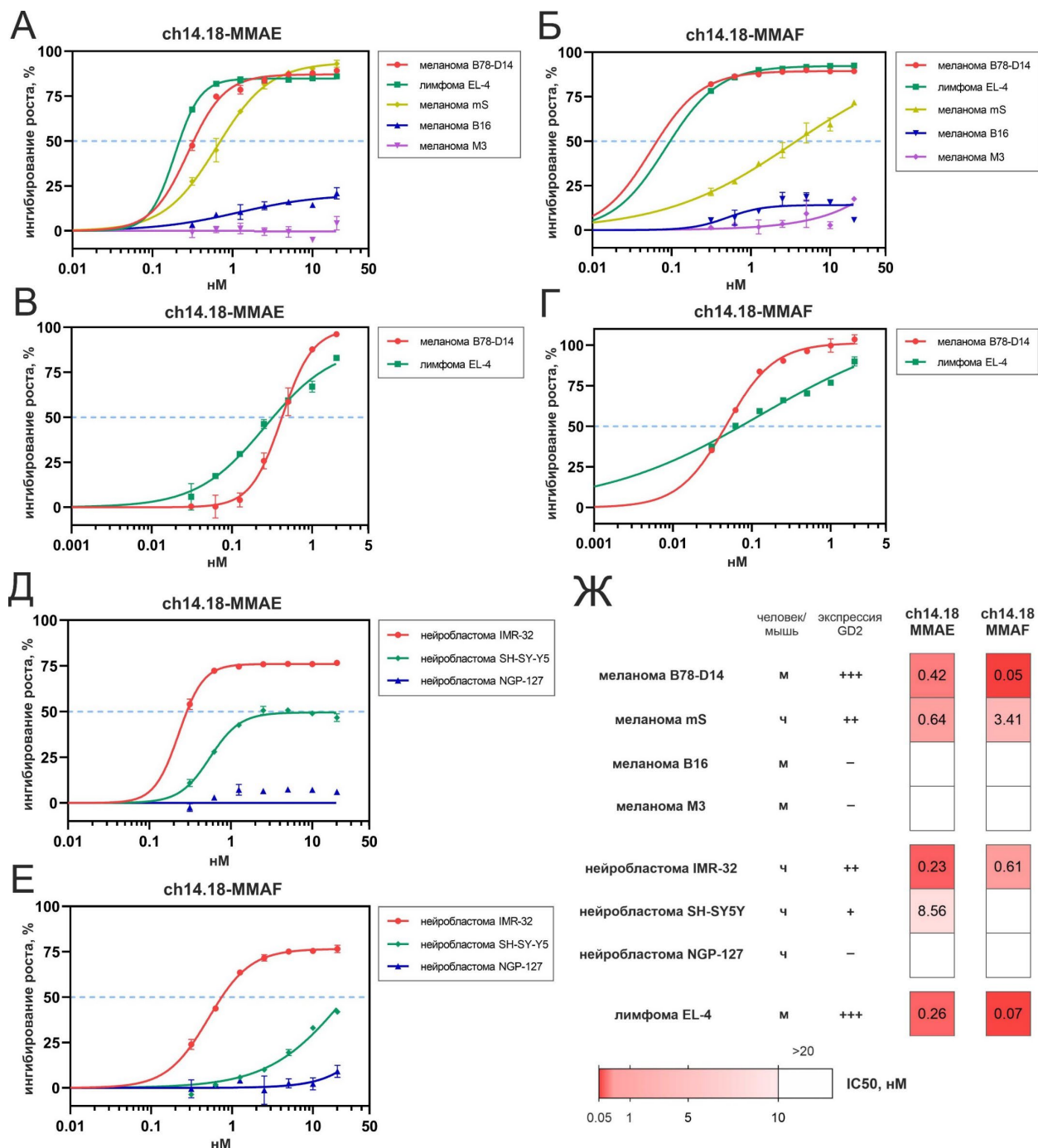


Рисунок 3.14. Цитотоксическая активность GD2-специфичных ADC в опухолевых клеточных линиях. А-Е. Ингибирование роста линий с различной экспрессией ганглиозида GD2 проанализировано в МТТ-тесте после 72 ч инкубации с конъюгатами ch14.18-MMAE (А, В, Д) либо ch14.18-MMAF (Б, Г, Е). Данные представлены как среднее ± SEM трех реплик репрезентативного эксперимента. Ж. Тепловая карта корреляции между экспрессией ганглиозида GD2 в панели клеточных линий и значениями концентраций полумаксимального

ингибирования (IC50), полученными в МТТ-тесте для конъюгатов ch14.18-ММАЕ либо ch14.18-ММАF. Указано происхождение клеточных линий – человеческие либо мышинные; линии дифференцированы по экспрессии антигена как гиперэкспрессирующие GD2 (+++), экспрессирующие GD2 на высоком (++) или на низком (+) уровне, либо без экспрессии GD2 (-).

Прямая корреляция цитотоксических эффектов ch14.18-ММАЕ и ch14.18-ММАF с уровнем ганглиозида GD2 на клетках наблюдалась и в трех линиях человеческой нейробластомы с высокой (линия IMR-32), низкой экспрессией (линия SH-SY-5Y), либо не экспрессирующих антиген (линия NGP-127) (**рисунок 3.14, Д и Е**). Концентрации конъюгатов ch14.18-ММАЕ и ch14.18-ММАF, необходимые для достижения IC50 в линии нейробластомы IMR-32 с высокой экспрессией GD2, составили 229 ± 69 пМ и 606 ± 158 пМ, соответственно.

Корреляция между экспрессией ганглиозида GD2 в панели клеточных линий и значениями IC50, полученными в МТТ-тесте при инкубации с ADC, представлена в тепловой карте на **рисунке 3.14, Ж**. Среди проанализированных линий, ch14.18-ММАF был более эффективен в линиях с гиперэкспрессией GD2, в то время как ch14.18-ММАЕ проявлял более выраженные эффекты в линиях, экспрессирующих GD2 на более низком уровне. Важно отметить, что обе линии меланомы B78-D14 и лимфомы EL-4, характеризующиеся наиболее высокой экспрессией ганглиозида GD2 и обозначенные в работе как гиперэкспрессирующие маркер, имеют мышинное происхождение, в то время как все линии экспрессирующие GD2, но на более низком уровне, являются человеческими.

Параллельно с анализом цитотоксических эффектов ADC в опухолевых линиях с различной экспрессией ганглиозида GD2 представлялось важным оценить действие отдельных компонентов ADC – антитела и лекарств класса ауристатинов – на используемые линии. ММАЕ и ММАF подавляли рост как GD2-положительных, так и GD2-отрицательных линий в МТТ-тесте, причём ММАЕ был значительно более токсичен, чем ММАF во всех случаях (**рисунок 3.15, А и Б**; $n=3$, $p<0.05$). Значения IC50 для ММАF были сравнимы во всех проанализированных линиях (IC50 в интервале 25-45 нМ), в то время как значения IC50 для ММАЕ варьировались от линии к линии, но зависимости между уровнем экспрессии GD2 в клеточных линиях и цитотоксичностью обнаружено не было.

В литературе [57, 327], в том числе в работах нашей лаборатории [325, 390], показано, что различные GD2-специфичные антитела в состоянии индуцировать прямую гибель клеток в GD2-положительных опухолевых линиях, поэтому цитотоксические эффекты антитела ch14.18 были проанализированы в линиях меланомы B78-D14 и лимфомы EL-4, характеризующихся наибольшей экспрессией GD2 среди всех линий в работе (RFI 98 и RFI 67, соответственно). Инкубация с антителом ch14.18 приводила лишь к слабому ингибированию роста данных линий

в широком диапазоне концентраций (**рисунок 3.15, В**), что говорит о том, что антитело ch14.18 не вносит значимого вклада в наблюдаемые для ADC эффекты в выбранных линиях.

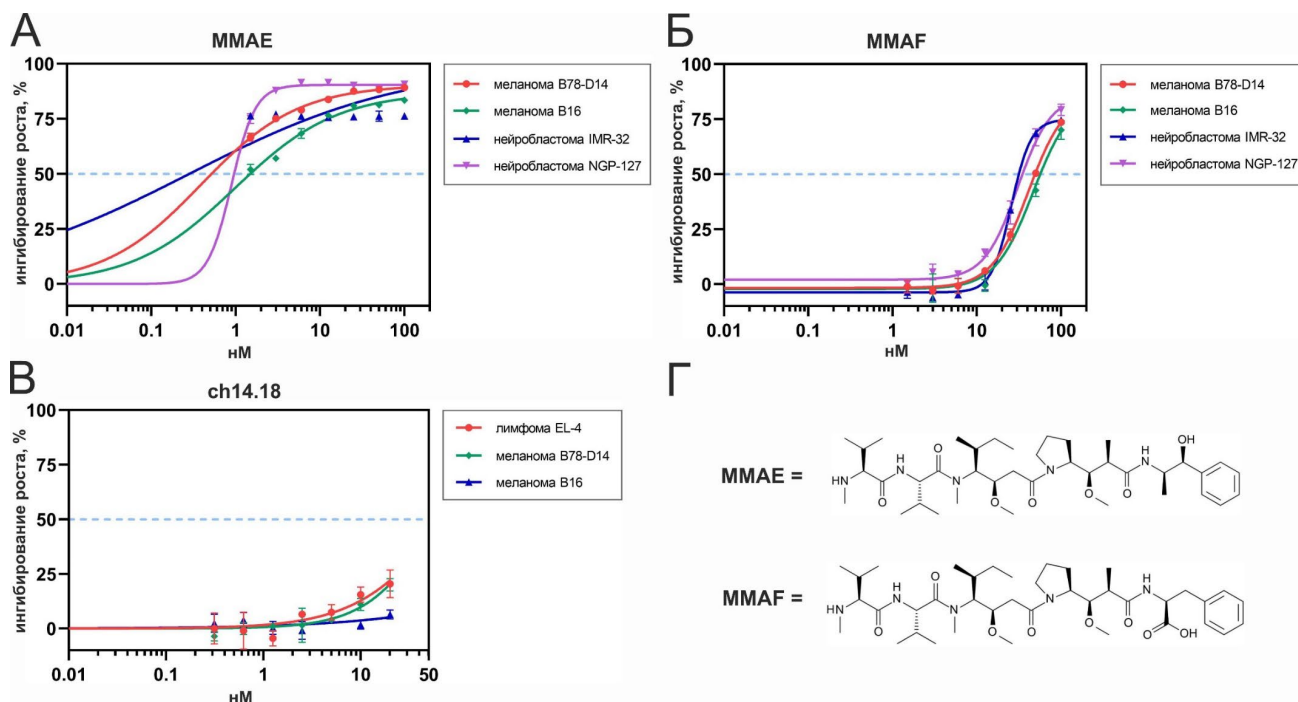


Рисунок 3.15. Цитотоксическая активность ауристатинов MMAE и MMAF, а также полноразмерного антитела ch14.18 в опухолевых клеточных линиях. А-В. Ингибирование роста проанализировано в MTT-тесте после 72 ч инкубации с MMAE (**А**), MMAF (**Б**), либо ch14.18 (**В**). Линии меланомы B78-D14 и лимфомы EL-4 характеризуются гиперэкспрессией ганглиозида GD2, нейробластома IMR-32 экспрессирует GD2 на высоком уровне, тогда как меланома B16 и нейробластома NGP-127 не экспрессируют GD2. В MTT-тесте использованы неконъюгированные с линкером ауристатины MMAE и MMAF, структуры которых изображены на рисунке Г.

Вышеупомянутые различия между цитотоксической активностью GD2-специфичных конъюгатов антител с лекарствами MMAE и MMAF вероятно опосредованы свойствами самих малых молекул. Оба лекарства структурно схожи (**рисунок 3.15, Г**) 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. MMAE обладает значительной липофильностью, 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. В то же время, MMAF намного лучше накапливается в антиген-позитивных

клетках. Данные различия показаны для ряда ADC одинаковой специфичности, несущих ММАЕ либо ММАФ [391, 243, 136]. Дополнительным фактором, способствующим уменьшению концентрации ММАЕ в антиген-экспрессирующих клетках, является то, что он, в отличие от ММАФ, служит субстратом ряда белков множественной лекарственной резистентности – эффлюксных мембранных транспортеров, которые опухоли экспрессируют в ответ на терапию [392, 393, 394]. Таким образом, можно ожидать, что полученный в работе конъюгат GD2-специфичного антитела с ММАФ будет проявлять более сильные эффекты в терапии опухолей, характеризующихся высокой экспрессией GD2, тогда как конъюгат с ММАЕ окажется предпочтительнее для терапии опухолей с низкой либо гетерогенной экспрессией антигена.

3.5.2. Конъюгаты минибоди и scFv-фрагмента с лекарствами ММАЕ и ММАФ.

Анализ цитотоксических эффектов конъюгатов минибоди и scFv-фрагмента антитела с лекарствами ММАЕ и ММАФ был проведен в клеточных линиях меланомы и нейробластомы с различной экспрессией ганглиозида GD2. В экспериментах в GD2-положительной мышинной меланоме B78-D14, значения IC50 для минибоди-ММАЕ и scFv-ММАЕ составили 9.5 ± 0.7 нМ и 176.1 ± 5.3 нМ (рисунок 3.16, А и В), тогда как значения для минибоди-ММАФ и scFv-ММАФ составили 1.9 ± 0.2 нМ и 17.4 ± 0.6 нМ (рисунок 3.16, Б и Г), соответственно. В то же время, для всех FDC, эффекты практически не наблюдались в GD2-отрицательной линии мышинной меланомы B16.

Функциональная активность конъюгатов была также проанализирована в двух линиях человеческой нейробластомы, GD2-положительной линии IMR-32 и GD2-отрицательной линии NGP-127; нейробластома IMR-32 экспрессирует GD2 на высоком уровне, однако значительно уступающем уровню экспрессии в линии меланомы B78-D14. Значения IC50 в клетках нейробластомы IMR-32 для минибоди-ММАЕ и scFv-ММАЕ составляли 67.3 ± 5.7 нМ и 78.7 ± 4.3 нМ (рисунок 3.16, А и В), а для минибоди-ММАФ и scFv-ММАФ они составляли 94.8 ± 12.2 нМ и 120 ± 9.8 нМ (рисунок 3.16, Б и Г), соответственно. Эффекты конъюгатов в GD2-отрицательной линии NGP-127 были выражены слабо. Таким образом, все конъюгаты проявили незначительные цитотоксические эффекты в отношении GD2-отрицательных клеточных линий, что подчеркивает селективность действия конъюгатов в отношении GD2-экспрессирующих клеток.

По результатам анализа цитотоксической активности FDC, эффекты конъюгатов минибоди с лекарством в GD2-положительных линиях значительно превосходили эффекты конъюгатов scFv-фрагмента с лекарством для обоих ауристатинов, 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).

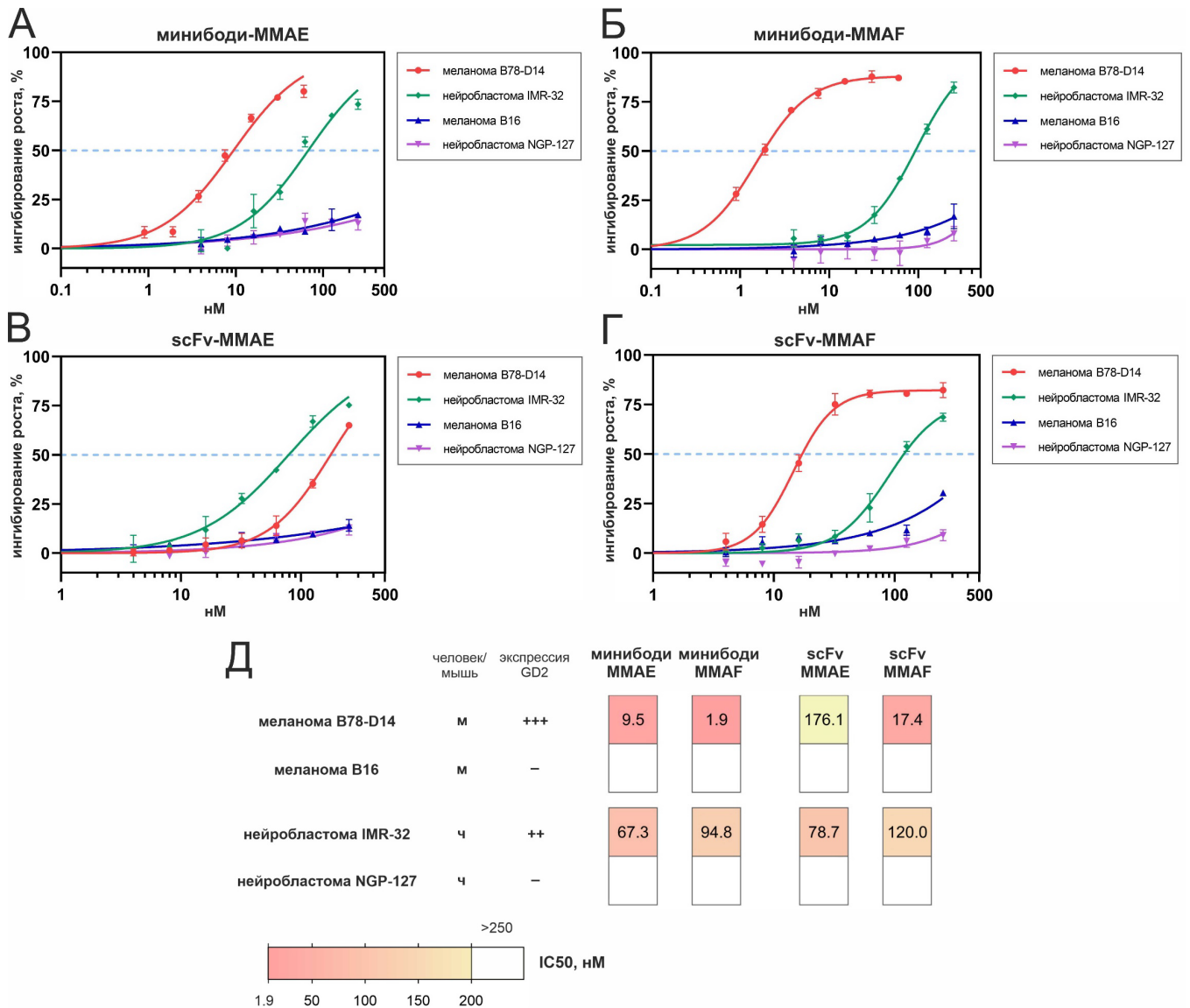


Рисунок 3.16. Цитотоксическая активность GD2-специфичных FDC в опухолевых клеточных линиях. А-Г. Ингибирование роста проанализировано в MTT-тесте после 72 ч инкубации с конъюгатами минибоди-MMAE (А), минибоди-MMAF (Б), scFv-MMAE (В) либо scFv-MMAF (Г). Д. Тепловая карта корреляции между экспрессией ганглиозида GD2 и значениями IC50, полученными в MTT-тесте после инкубации линий с FDC. Указано происхождение клеточных линий – человеческие либо мышиные; линии дифференцированы по экспрессии антигена как гиперэкспрессирующие GD2 (+++), экспрессирующие GD2 на высоком уровне (++) , либо без экспрессии GD2 (-).

Интересно, что с использованием двух форматов фрагментов антител были подтверждены закономерности, наблюдаемые для GD2-специфичных полноразмерных ADC несущих лекарства MMAE либо MMAF: конъюгаты минибоди и scFv-фрагмента 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.

3.5.3. Пегилированные конъюгаты scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4.

Для анализа цитотоксической активности пегилированных конъюгатов scFv-фрагментов антител с лекарствами DM1 и DM4 была выбрана пара линий GD2-положительной меланомы B78-D14 и GD2-отрицательной меланомы B16.

Конъюгаты scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 вызывали сильное ингибирование пролиферации GD2-положительных клеток B78-D14 значимо отличающееся от эффектов в GD2-отрицательных клетках B16 (рисунок 3.17, А и Б, соответственно; $p < 0.05$, $n = 3$). Значения IC_{50} в клетках линии B78-D14 составили 33.1 ± 2.1 нМ для конъюгата scFv-PEG4-DM4 и 82.3 ± 4.2 нМ для scFv-PEG4-DM1, что говорит о том, что цитотоксичность явно зависит от типа лекарства и примерно в два раза выше в случае конъюгата, несущего DM4, в сравнении с конъюгатом, несущим DM1. Оба пегилированных FDC проявили значительно более слабые эффекты в GD2-отрицательной линии B16, вызывая ингибирование роста на $43.4 \pm 2.1\%$ и $41.5 \pm 2.9\%$ для scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 соответственно в наиболее высокой использованной в анализе концентрации (370 нМ), что демонстрирует селективную активность конъюгатов в GD2-положительных клетках.

В ранее проведенном нами исследовании [11] пегилированные мультимеры GD2-специфичных scFv-фрагментов антител (в частности, конъюгат взятых в эту работу scFv-фрагмента и четырехвалентного полиэтиленгликоля PEG4, scFv-PEG4) вызывали прямую гибель клеток в GD2-экспрессирующих линиях. Однако прямая индукция клеточной гибели не наблюдалась для мономера scFv-фрагмента. По этой причине, параллельно с пегилированными FDC, в данной работе представлялось важным проанализировать цитотоксическое действие пегилированного мультимера scFv в используемых клеточных линиях.

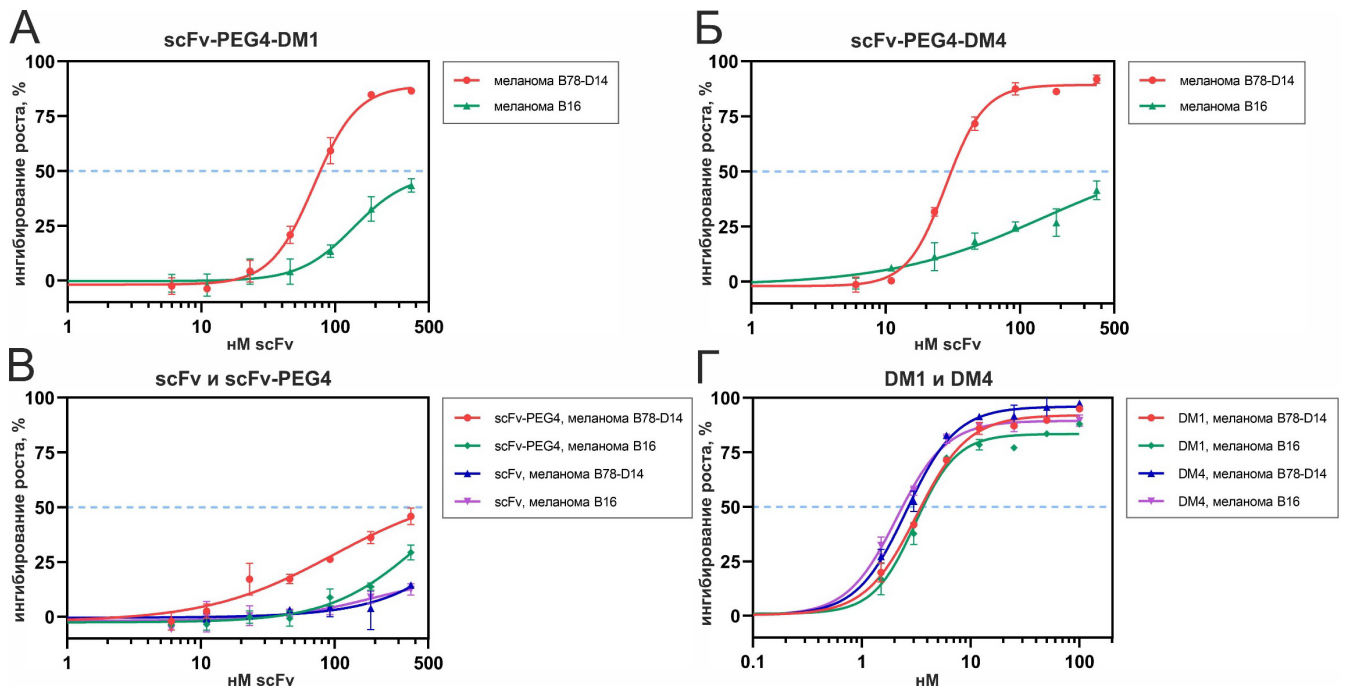


Рисунок 3.17. Цитотоксическая активность GD2-специфичных пегилированных FDC в GD2-положительной линии меланомы B78-D14 и GD2-отрицательной линии меланомы B16. А-Г. Ингибирование роста клеточных линий проанализировано в MTT-тесте после 72 ч инкубации с конъюгатами scFv-PEG4-DM1 (А), scFv-PEG4-DM4 (Б), scFv-фрагментом либо пегилированным мультимером scFv (scFv-PEG4) (В), лекарствами DM1 либо DM4 (Г).

Как показано на **рисунке 3.17, В**, scFv-PEG4 вызывал прямую гибель клеток в GD2-положительной линии B78-D14 и, в значительно меньшей степени, в GD2-отрицательной линии B16, в то время как цитотоксические эффекты неконъюгированного scFv-фрагмента отсутствовали в широком диапазоне проанализированных концентраций. В то же время, цитотоксическая активность scFv-PEG4 в линии меланомы B78-D14 была сравнительно низка, что не позволило определить значение IC₅₀ даже на максимальной взятой в анализ концентрации препарата. Токсичность входящего в состав конъюгатов полиэтиленгликоля (PEG4) была незначительна в обеих линиях на всем диапазоне исследуемых концентраций (представлено в [395]). Это говорит о том, что эффекты пегилированных FDC в первую очередь опосредованы входящими в их состав майтанзиноидами DM1 и DM4.

Цитотоксическая активность свободного DM4 была несколько более выражена в сравнении с DM1 в обеих проанализированных линиях меланомы (**рисунке 3.17, Г**). 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 [140] и обусловлена присутствием двух дополнительных метиловых групп на углеводе, связанном с тиолом молекулы (**рисунок 3.10, Б**), 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 таргетных клетках (*bystander* эффект), однако данный эффект более выражен для DM4.

Способность GD2-специфичных пегилированных FDC проявлять *bystander* эффект будет зависеть от типов активных метаболитов, образующихся после антиген-опосредованной интернализации. Исследователи из фармацевтической компании ImmunoGen, создателя обоих клинически одобренных на сегодняшний день ADC несущих майтанзиноиды, показали [187], что сравнение активности майтанзиноидов в составе ADC и их *bystander* эффекта крайне важно проводить с учетом используемого линкера и сайта конъюгации к антителу. Так, в случае конъюгации DM1 и DM4 к лизинам антитела посредством расщепляемого дисульфидного линкера, метаболиты обоих майтанзиноидов (DM1-SMe и DM4-SMe) были способны убивать антиген-негативные клетки; метаболит DM4 делал это несколько более эффективно. В случае же конъюгации майтанзиноидов к лизинам антитела посредством нерасщепляемого тиоэфирного линкера, основным метаболитом после протеолитического расщепления ADC в лизосомах в обоих случаях являлся положительно заряженный комплекс майтанзиноид-линкер-лизин – оба метаболита эффективно связывались с тубулином антиген-положительных клеток и уничтожали их, однако были не в состоянии проникать в находящиеся в ко-культуре антиген-негативные клетки. Для использованного в работе анти-GD2 scFv-фрагмента было показано попадание в лизосомальные компартменты после интернализации в клетки меланомы B78-D14 [137]. Интернализация и процессинг scFv-PEG4-DM1 и scFv-PEG4-DM4 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 [396, 397], и 2) пегилированные майтанзиноиды PEG4-DM1/DM4, образующиеся в ходе лизосомального протеолиза scFv-фрагмента. Цепи полиэтиленгликоля подвергаются лишь незначительной деградации в клетках (например, под действием активных форм кислорода [398]), а их конъюгаты с майтанзиноидами будут практически неспособны диффундировать через клеточные мембраны. Однако свободные DM1 и DM4 будут проявлять *bystander* эффект [399].

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 GD2-специфичными конъюгатами, а также ввиду сравнительной сложности их синтеза. Возможными направлениями оптимизации данного формата FDC представляются введение в состав конъюгата биорасщепляемого линкера, а также использование для синтеза конъюгата гетерофункциональных молекул ПЭГ, что может позволить упростить методику очистки и повысить гомогенность конечного продукта. 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 крови.

3.6. Биораспределение GD2-специфичных молекул в мышинной модели рака.

3.6.1. Анализ ADC и полноразмерного антитела.

Кинетика накопления антител и их конъюгатов с лекарствами в опухоли, а также их время циркуляции в организме напрямую влияют на эффективность терапии. Для того, чтобы попасть в солидную опухоль, внутривенно введенное опухолеспецифичное антитело должно преодолеть слаборазвитую сосудистую сеть опухоли, плотные тканевые барьеры и повышенное межтканевое давление в опухолевом микроокружении. Известно, что конъюгация антитела с лекарствами, в частности с ингибиторами полимеризации тубулина ауристинатами [400] и майтанзиноидами [401], может в случае высокой степени пришивки лекарства к антителу сильно изменять профиль его биораспределения, приводя к агрегации и более быстрому выведению ADC из организма. Слишком быстрое выведение ADC из организма негативно сказывается на его накоплении 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 [87]. Фармакокинетика же фрагментов антител и их конъюгатов с лекарствами в организме еще более непредсказуема ввиду сильно отличающихся молекулярной массы и стабильности в крови каждого отдельно взятого формата молекул. В то же время, количество работ, в которых были бы проведены фармакокинетические исследования формата минибоди, крайне ограничено. По этим причинам, 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 мышинной модели.

В анализ биораспределения полноразмерного конъюгата антитела с лекарством в сравнении с его родительским антителом был взят конъюгат ch14.18-MMAE. Для создания *in vivo* модели здесь и в последующих экспериментах была использована линия мышинной 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 флуоресцентно-меченные по аминокислотной группе радикала аминокислоты лизина ADC ch14.18-MMAE DAR 2.8 и антитело ch14.18, а биораспределение в плазме крови и основных органах анализировали через 24 и 48 ч после инъекции. Использование ADC с пониженным DAR обусловлено тем, что флуоресцентно-меченный конъюгат ch14.18-MMAE DAR 4.4 подвергался частичной деградации уже на стадии мечения флуорофором и проявлял существенно более низкое связывание с ганглиозидом GD2 в прямом ИФА, в то время как меченый конъюгат ch14.18-MMAE DAR 2.8 сохранял способность связываться с антигеном на уровне сравнимом с немеченым ADC (см. **рисунок 1 приложения 3**).

Результаты анализа, представленные в виде процента введенной дозы на грамм соответствующей ткани, изображены на **рисунке 3.18** (числовые значения см. в **таблице 1 приложения 4**). GD2-специфичные ADC и антитело показали сопоставимый профиль биораспределения в мышинной модели рака. Накопление ch14.18-MMAE в опухоли статистически значимо не отличалось от накопления антитела ch14.18 в обеих проанализированных временных точках – содержание ADC и антитела в опухоли увеличивалось с 3.6% против 3.2% введенной дозы на грамм ткани (% ID/g) через 24 ч 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 (11 % препарата), 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. Таким образом, можно сделать вывод, что конъюгация антитела с лекарством с заданной степенью пришивки DAR не оказывает значимого влияния на его фармакокинетические свойства в выбранной модели *in vivo*.

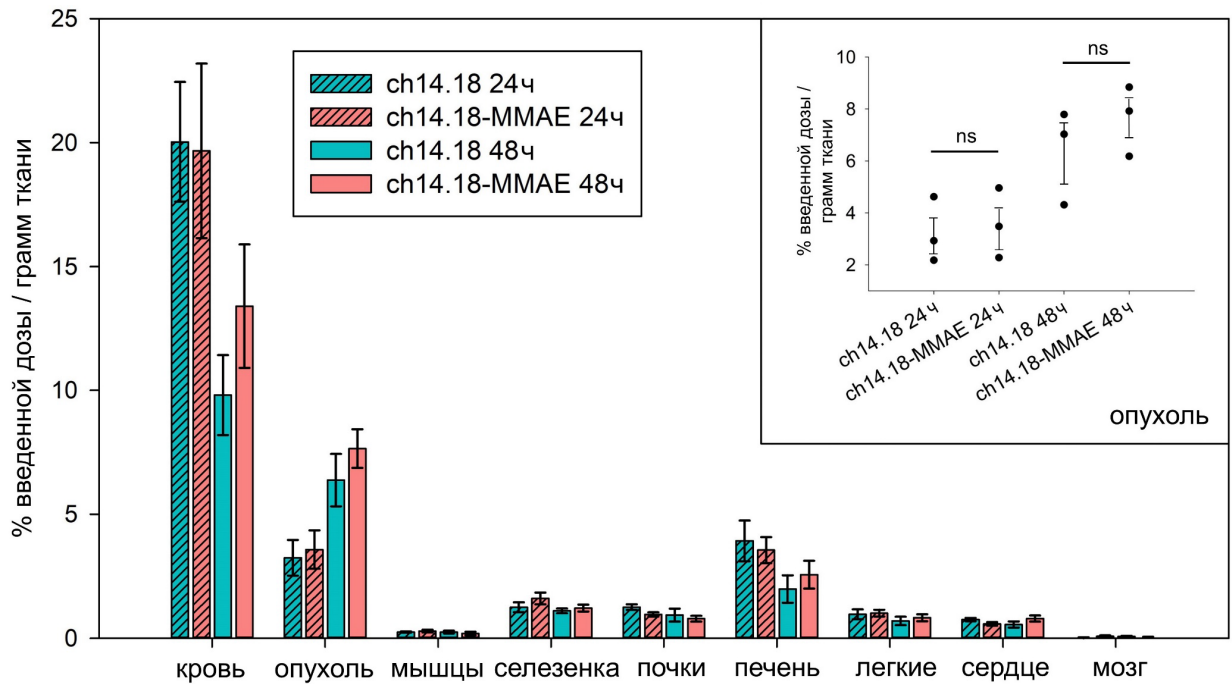


Рисунок 3.18. Биораспределение и накопление в опухоли GD2-специфичного ADC ch14.18-MMAE (DAR 2.8) и неконъюгированного антитела ch14.18 проанализировано через 24 ч и 48 ч после внутривенного введения по 7.5 мг/кг препаратов в мышинной модели GD2-положительной меланомы. Во вкладке справа дополнительно представлена точечная диаграмма накопления в опухоли для отдельных мышей; 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), а значения выражены как среднее \pm SEM, рассчитанные для групп из $n=3$ животных.

Стоит отметить, что содержание препаратов в тканях мышей было проанализировано после тщательной кардиальной перфузии, за конечную точку которой обычно принимают посветление ткани печени до светло-коричневого цвета [402]. Известно, что значительная часть лекарства (иногда более 50%) в гомогенате многих тканей приходится на остаточную кровь сосудистого русла, что может приводить к существенным различиям в детектируемой концентрации лекарства в тканях, подвергнутых либо не подвергнутых перфузии [403]. Мы наблюдали подобную разницу для накопления флуоресцентно-меченных молекул в печени, почках, легких и других органах мышей в наших предварительных экспериментах.

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 [404], часто приводят к нежелательному увеличению накопления конъюгатов в печени и их ускоренному клиренсу. Так, например, в работе Sun et al. [401] с использованием серии конъюгатов антител с

майтанзиноидами (с расщепляемым и нерасщепляемым линкером), было показано, что ADC с $DAR > 6$ накапливаются в печени сильнее, выводятся из организма быстрее, и демонстрируют более низкую эффективность *in vivo* в сравнении с ADC с $DAR 3-4$. Аналогичный вывод сделан и в другой работе [400], где изучили влияние степени пришивки лекарства MMAE, конъюгированного к антителу посредством линкера идентичного используемому нами, на эффективность в мышинной модели рака. В то время как цитотоксическая активность *in vitro* напрямую зависела от DAR конъюгатов, противоопухолевая активность *in vivo* конъюгата с $DAR 4$ была сравнима с таковой для конъюгата с $DAR 8$. Эти и другие [405, 406] исследования выделяют $DAR 3-4$ как наиболее оптимальный для максимизации терапевтического индекса конъюгатов полноразмерных антител с ауристатинами и мйттанзиноидами. Исключения представляют стратегии, повышающие гидрофильность ADC (например, посредством включения в состав линкера разветвленных молекул ПЭГ [382]).

В главе 3.1.1 этой работы 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 (данные не представлены), однако они не были взяты в эксперименты *in vivo*, поскольку для них ожидалась неоптимальные фармакокинетические параметры и повышенная системная токсичность.

3.6.2. Анализ минибоди и полноразмерного антитела.

В следующем эксперименте проведено сравнение биораспределения и накопления в опухоли в этой же мышинной модели рака для GD2-специфичных минибоди и антитела ch14.18, на основе которых получены конъюгаты с лекарствами класса ауристатинов. Первоначально планировалось проанализировать биораспределение непосредственно для конъюгатов минибоди-MMAE и минибоди-MMAF, однако меченные выбранным флуоресцентным красителем FDC характеризовались низкой стабильностью. В то же время, флуоресцентно-меченное по остаткам лизина минибоди демонстрировало высокую стабильность в растворе, а его антиген-связывающие свойства в прямом ИФА почти не уступали интактному минибоди (см. **рисунок 2 приложения 3**). По нашим данным, это первое фармакокинетическое исследование анти-GD2 минибоди *in vivo*.

Биораспределение минибоди и антитела в плазме крови и основных органах анализировали через 2, 4, 8 и 24 ч после внутривенного введения. Результаты анализа в виде процента введенной дозы препарата в пересчете на грамм типа ткани или плазмы крови (% ID/g) представлены на **рисунке 3.19, А и Б**, а числовые значения накопления в тканях дополнительно сведены в **таблицу 2 приложения 4**. Как видно из **рисунка 3.19, А**, динамика накопления в опухоли

существенно различается для минибоди и полноразмерного антитела. 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%). Стоит также отметить, что в пересчете на молярные количества препаратов, достигшие опухоли, накопление минибоди в точках 2-4 ч после введения значимо (более чем в 2 раза) превосходило накопление ch14.18, что отражает разницу в молекулярных массах молекул – 80 кДа у минибоди против 150 кДа у полноразмерного IgG.

Большая разница в содержании молекул в плазме крови (**рисунок 3.19, 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 (0.7% исходно введенного минибоди) и 22% ID/g антитела (18% исходно введенного антитела).

Наблюдаемую разницу в динамике содержания молекул в опухоли и в крови можно свести к следующим ключевым факторам: с одной стороны, минибоди, вероятно благодаря своему меньшему размеру, способно несколько более эффективно проникать в опухолевую ткань в первые часы после введения; с другой стороны, значительно более длительное время циркуляции полноразмерного антитела в крови обеспечивает его преимущественное накопление в опухоли на более поздних сроках анализа.

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 (почечной) фильтрации, обычно принимаемый за 60-70 кДа [407], молекулярная масса минибоди близка к его пороговому значению.

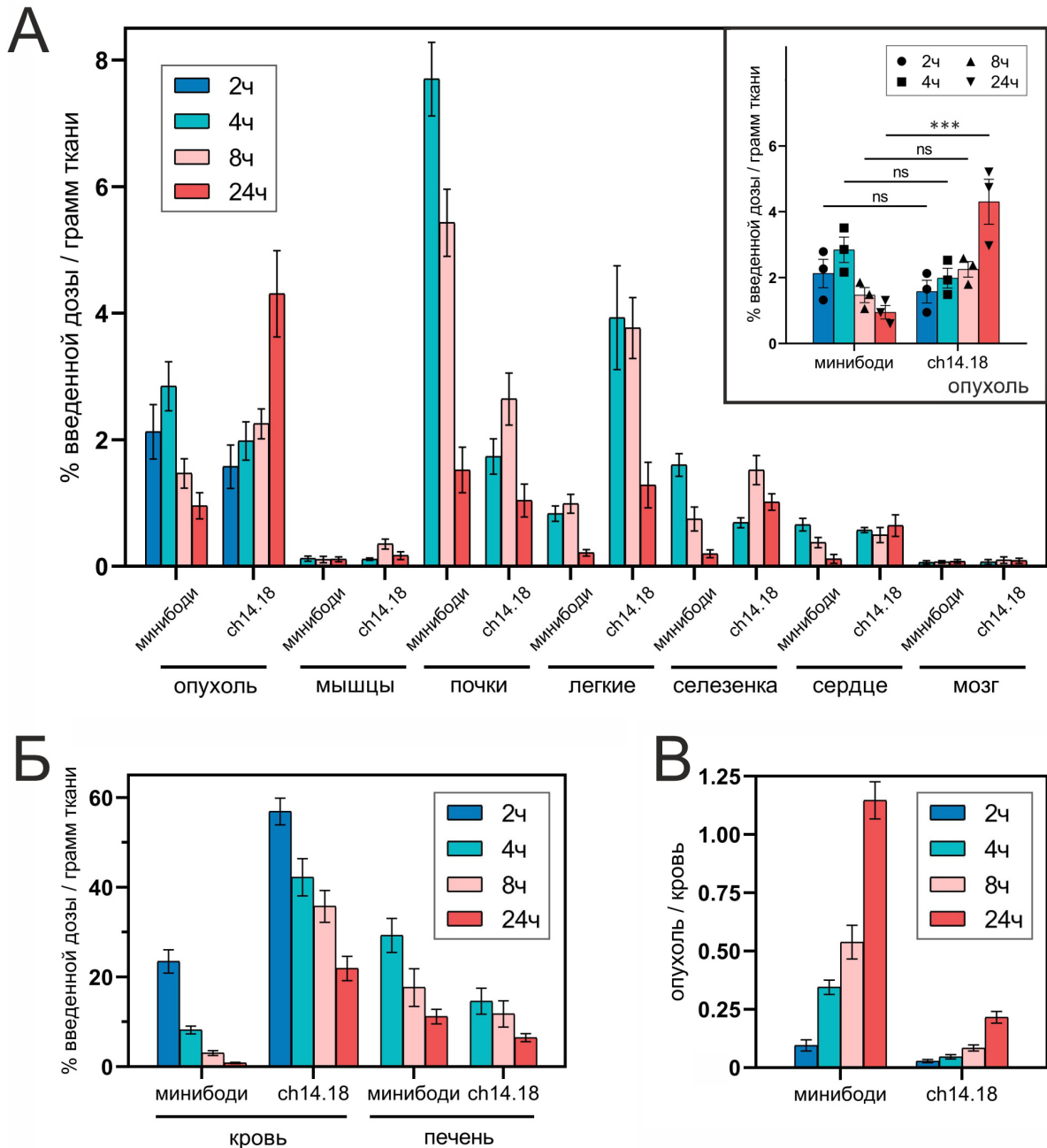


Рисунок 3.19. Биораспределение и накопление в опухоли GD2-специфичных минибоди и антитела ch14.18 проанализировано через 2, 4, 8 и 24 ч после внутривенного введения по 7.5 мг/кг массы препаратов в мышинной модели GD2-положительной меланомы. **А.** Опухоль и органы мышей. Во вкладке справа дополнительно представлена точечная диаграмма накопления в опухоли для отдельных мышей; ns, нет значимого отличия между группами; ***, $P < 0.001$; непарный *t*-тест. **Б.** Плазма крови и печень мышей. **В.** Соотношение «опухоль/кровь» (tumor-to-blood ratio, 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, рассчитанные для групп из $n=3$ животных.

Накопление обеих молекул в печени было наиболее высоким среди всех органов мышей, 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. Известно, что как для полноразмерных антител, так и для многих фрагментов антител характерно повышенное выведение через печень и другие органы мононуклеарной фагоцитарной системы в сравнении с низкомолекулярными препаратами. Это объясняется экспрессией клетками этих органов (клетками Купфера в печени) различных типов Fcγ-рецепторов, которые взаимодействуют с Fc-доменом антител и приводят к их интернализации и катаболизму, а также крупным размером молекул, способствующим их задержке в сосудистых компартментах органов [87, 408].

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 полноразмерных антител из тканей обратно в кровоток. Это объясняется тем, что хотя минибоди и имеют в составе константный домен C_{H3}, для функционирования FcRn-рецептора как у мышей, так и у человека требуется его специфическое связывание с областью взаимодействия между доменами C_{H2} и C_{H3}, формирующейся только в полноразмерных антителах [409]. Так, в работах коллектива исследователей, которыми был впервые получен формат минибоди (scFv-C_{H3})₂ [257], было показано, что введение в структуру минибоди дополнительного домена C_{H2} приводит к тому, что фармакокинетические свойства молекулы (scFv-C_{H2}-C_{H3})₂ с массой 105 кДа в мышцах становятся схожими с полноразмерным антителом аналогичной специфичности (увеличенное время полужизни в крови, пониженное накопление в почках и печени), но при последующем введении в полученную структуру двух точечных мутаций предотвращающих связывание с FcRn-рецептором, её биораспределение вновь становится похожим на минибоди с массой 80 кДа [410, 411]. Таким образом, для данного формата фрагментов антител взаимодействие с неонатальным Fc-рецептором играет не менее важную роль в определении фармакокинетики, чем размер молекулы.

Более высокое суммарное накопление GD2-специфичного 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 [273, 275]. При этом примечательно,

что для ряда конъюгатов фрагментов антител с лекарствами, показавших высокую противоопухолевую активность в животных моделях – конъюгатов на основе минибоди [291], его аналога формата SIP (где вместо константного домена $\gamma 1C_{H3}$ использован домен ϵC_{H4} человеческого IgE) [198], и диабоди [290] – наблюдалось сопоставимое, но не преимущественное накопление в опухоли по сравнению с конъюгатами полноразмерных антител с лекарствами в первые часы после внутривенного введения, при введении препаратов в одинаковых дозах по массе. В то же время, накопление данных FDC в опухоли уступало ADC на более поздних сроках анализа (24 ч и более). Аналогичный результат получен и в нашем исследовании, где наблюдалось сравнимое в процентах введенной дозы на грамм ткани содержание GD2-специфичных минибоди и антитела ch14.18 в опухоли в первые часы после введения (2-8 ч), а через 24 ч после введения накопление минибоди в опухоли уже значительно уступало антителу. Таким образом, хотя в нашем анализе использованы немодифицированные минибоди и антитело ch14.18, а не их конъюгаты с лекарствами, выявленные закономерности согласуются с литературными данными ряда других исследований и обосновывают необходимость сравнения противоопухолевой эффективности GD2-специфичных конъюгатов минибоди-ММАЕ и минибоди-ММАF с полноразмерными ADC в адекватном режиме дозирования.

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 полноразмерного антитела на всех проанализированных временных точках (**рисунок 3.19, В**). Так, через 24 ч после введения препаратов TBR минибоди достигал значений >1 , тогда как для антитела этот показатель составлял ~ 0.2 . Полноразмерное антитело ch14.18 характеризуется значительно более продолжительной циркуляцией в кровотоке, что обуславливает его более высокое накопление в опухоли со временем. В то же время, более быстрое падение концентрации GD2-специфичного минибоди в крови и интенсивное выведение из организма приводят к его пониженному накоплению в нормальных тканях в сравнении с антителом на длительных интервалах времени – так, уже через 24 ч после инъекции накопление минибоди было значительно ниже в сравнении с антителом в тканях легких, селезенки и сердца. Высокое накопление минибоди в опухоли в первые часы после введения и одновременно его короткое время циркуляции потенциально позволяют расширить терапевтическое окно для его конъюгатов с лекарствами в сравнении с классическими ADC – другими словами, имеется возможность повышать вводимую дозу препарата при сохранении низкой токсичности по отношению к здоровым тканям.

3.7. Противоопухолевая активность *in vivo* конъюгатов полноразмерного антитела с лекарствами.

Изучение противоопухолевой активности полученных GD2-специфичных молекул в мышинной модели рака являлось одной из ключевых задач работы. Противоопухолевые эффекты конъюгатов полноразмерных антител с лекарствами ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF со степенью пришивки лекарства к антителу DAR 4 были проанализированы в мышинной модели GD2-положительной меланомы B78-D14. Оба ADC, введенные мышам в режиме 5 инъекций в дозировке 5 мг/кг массы, эффективно ингибировали рост опухолей (**рисунок 3.20, 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 (% ТРО) составил 66% для группы ch14.18-MMAE и 78% для группы ch14.18-MMAF. Важно отметить, что несмотря на использование иммунокомпетентной мышинной модели, которая позволяет [412] детектировать противоопухолевые эффекты химерного антитела ch14.18 – как прямую клеточную гибель, так и эффекты, вызванные иммуноассоциированными механизмами ADCC и СМС, статистически достоверных различий в росте опухолей группы контроля и группы, которой вводили ch14.18, обнаружено не было.

В ходе гистологического окрашивания опухолей животных, полученных по окончании эксперимента (**рисунок 3.20, Б**), 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.

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 3.21, А**. 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 (**рисунок 3.21, Б**), 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).

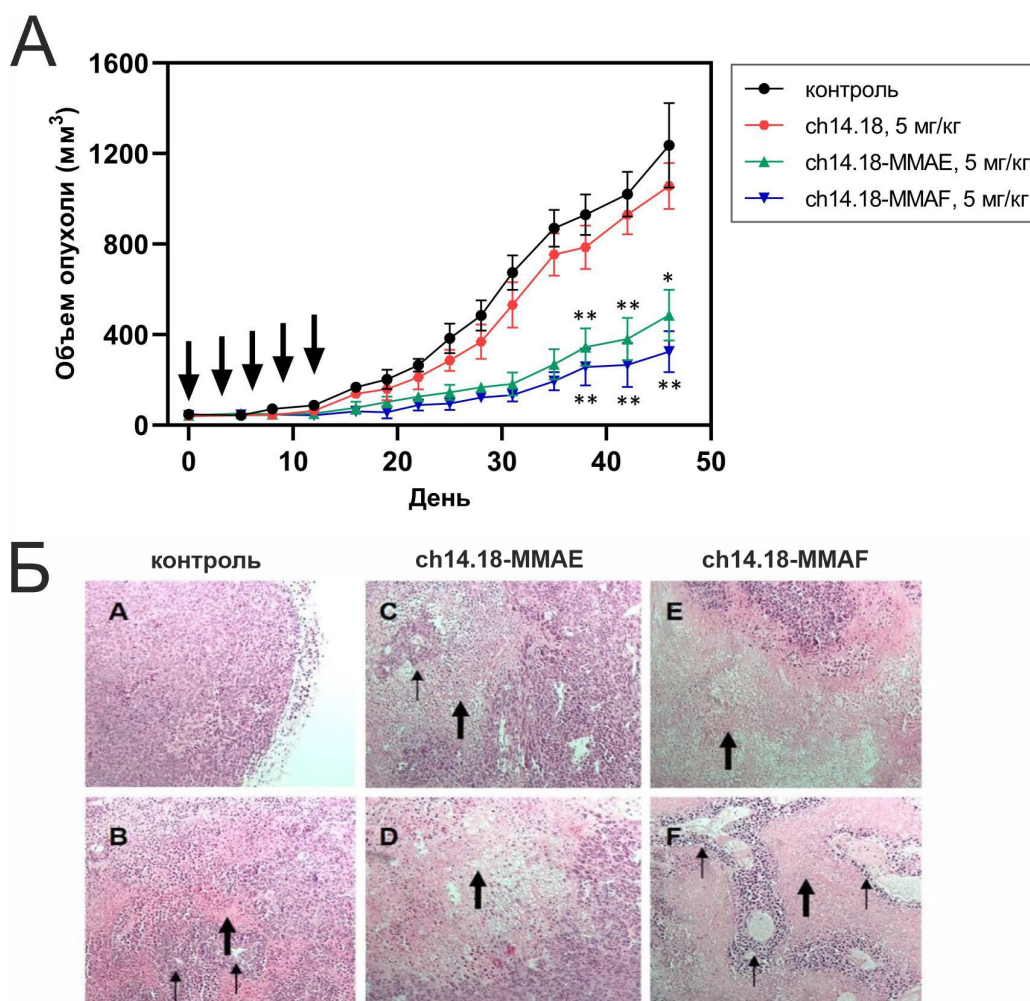


Рисунок 3.20. Противоопухолевая активность ADC ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF в мышинной модели GD2-положительной меланомы B78-D14 в дозе 5 мг/кг массы тела. А. Кривые динамики роста опухолей в самках мышей линии C57BL/6. При достижении опухолями группы контроля объема $1020 \pm 99 \text{ мм}^3$ (день 42 анализа), объем опухолей в группах, получавших препараты, составил $266 \pm 97 \text{ мм}^3$ для группы ch14.18-MMAF, $381 \pm 93 \text{ мм}^3$ для группы ch14.18-MMAE и $930 \pm 87 \text{ мм}^3$ для группы антитела ch14.18; значения представлены как среднее \pm SEM для групп из 4 животных. Дни ввода препаратов мышам указаны стрелками. *, $P < 0.05$ в сравнении с группой контроля; **, $P < 0.01$ в сравнении с группой контроля; непарный t-тест. **Б.** Гистологическое окрашивание опухолей группы контроля (латинские буквы A-B), группы ch14.18-MMAE (C-D) и группы ch14.18-MMAF (E-F). Тонкие стрелки указывают на кровеносные сосуды, толстые стрелки указывают на зоны некроза. Окрашивание посредством гематоксилина и эозина.

Только при введении мышам повышенной дозы ch14.18-MMAE формировались «некротические» полости, занимающие значительную часть опухоли (рисунок 3.21, 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. Образование полостей в опухоли в ответ на системную терапию достаточно необычно, поскольку противоречит классической картине регрессии опухоли начиная с иннервируемой кровеносными сосудами периферии к центру. В норме высокая экспрессия антигена и быстрое связывание препарата периваскулярными клетками создают *барьер связывающих сайтов*, удерживающий ADC вблизи сосудов [281]. В нашем случае, многократное введение высоких доз вероятно насытило периферические мишени, обеспечив глубокое проникновение препарата в опухоль. Дополнительную роль в доставке MMAE в центральную область опухоли играет его возможность проявлять *bystander* эффект.

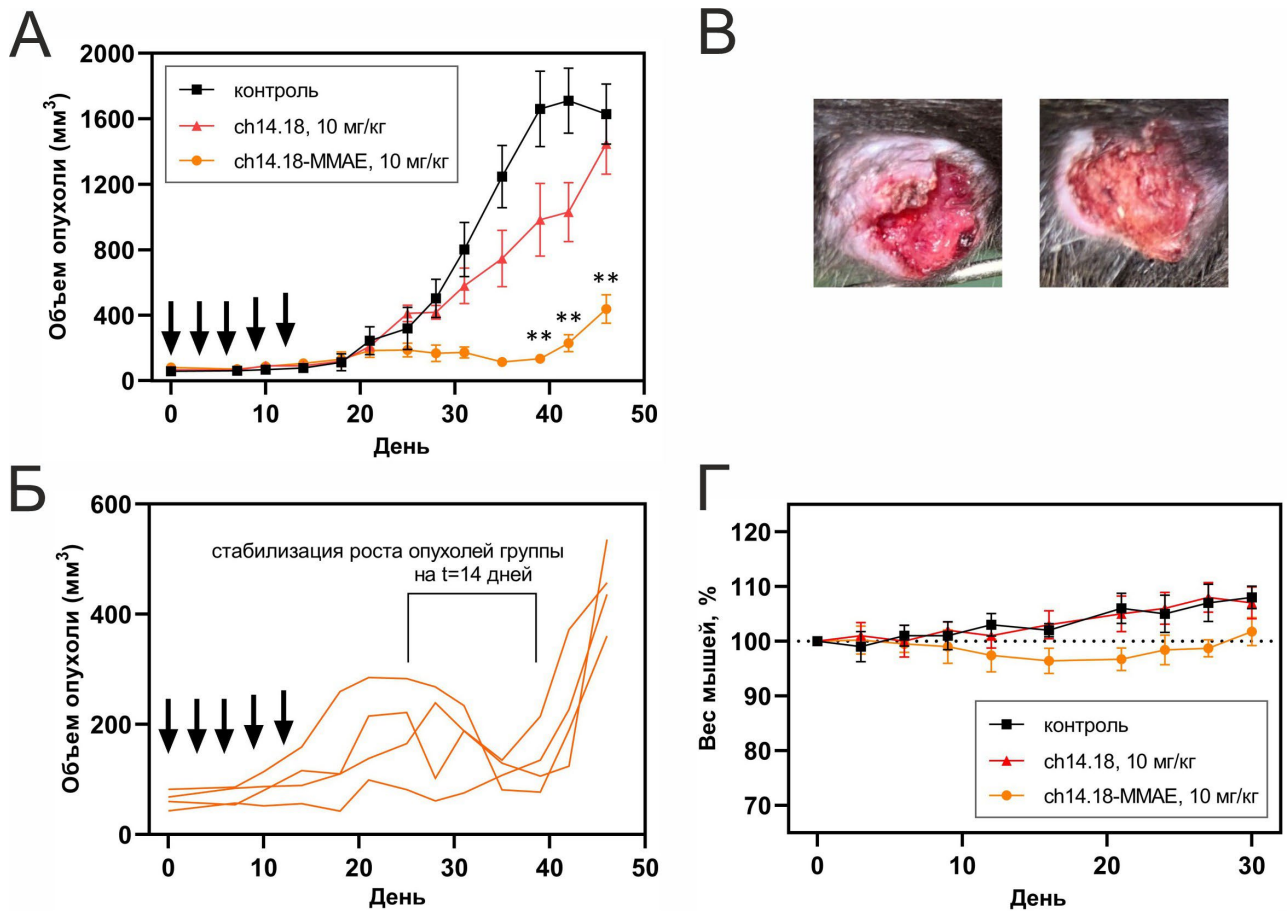


Рисунок 3.21. Противоопухолевая активность ADC ch14.18-MMAE в мышинной модели GD2-положительной меланомы B78-D14 в дозе 10 мг/кг массы тела. А. Кривые динамики роста опухолей в самцах мышей линии C57BL/6. При достижении опухолями группы контроля объема $1247 \pm 191 \text{ мм}^3$ (день 35 анализа), объем опухолей в группах, получавших препараты, составил $113 \pm 12 \text{ мм}^3$ для группы ch14.18-MMAE и $746 \pm 172 \text{ мм}^3$ для группы ch14.18; значения представлены как среднее \pm SEM для групп из 4 животных. Дни ввода препаратов мышам указаны стрелками. **, $P < 0.01$ в сравнении с группой контроля, непарный t -тест. **Б.** Индивидуальные кривые динамики роста опухолей мышей группы ch14.18-MMAE. **В.** Опухоли мышей группы ch14.18-MMAE, некроз опухолевой ткани на день 35 анализа. **Г.** Изменение веса мышей.

Гипоксические условия в ядре опухоли могут усиливать эффект лекарства. Клетки ядра опухоли более подвержены спонтанной гибели из-за дефицита питательных веществ [413]. Кроме этого, гипоксия может индуцировать гиперэкспрессию лизосомальной протеазы катепсина В, специфически расщепляющей линкер ADC по сайту дипептида валин-цитруллин с высвобождением MMAE [414]. Следовательно, клетки центральной области опухоли могут более эффективно высвобождать цитотоксический препарат после интернализации ADC, приводя к формированию «некротических» полостей. 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-MMAE и scFv-MMAE [364]. В ходе терапии в мышинной модели, при использовании повышенной дозы ch14.18-MMAE, интенсивность апоптоза в центральной области опухоли, вероятно, превысила возможности фагоцитарного клиренса, что способствовало развитию вторичного некроза.

Терапия конъюгатами ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF характеризовалась хорошей переносимостью животными без развития признаков системной токсичности в нескольких независимых экспериментах. Введение пяти инъекций ADC в дозе 5 мг/кг (**рисунок 3.22, Б** в **главе 3.8**) либо 10 мг/кг (**рисунок 3.21, Г**) не вызывало значимой потери массы тела у мышей в сравнении с контрольной группой. Сильное и дозозависимое ингибирование роста опухолей под действием GD2-специфичных ADC в мышинной модели меланомы B78-D14, а также сравнимая эффективность ch14.18-MMAF в другой мышинной модели GD2-положительной лимфомы EL-4, продемонстрированная вне данной работы [9], позволяют рассматривать исследуемые ADC в качестве кандидатов для терапии GD2-экспрессирующих опухолей человека.

3.8. Противоопухолевая активность *in vivo* конъюгатов минибоди с лекарствами.

Конъюгаты минибоди с лекарствами MMAE и MMAF были выбраны для исследования противоопухолевой активности в мышинной модели рака, поскольку они показали наиболее высокие цитотоксические эффекты в *in vitro* анализе в сравнении с другими GD2-специфичными FDC, а минибоди также демонстрировало благоприятные фармакокинетические свойства в эксперименте по биораспределению в мышцах. Терапевтическая активность GD2-специфичных FDC была проанализирована в сравнении с ADC в мышинной модели меланомы B78-D14 (**рисунок 3.22, А**).

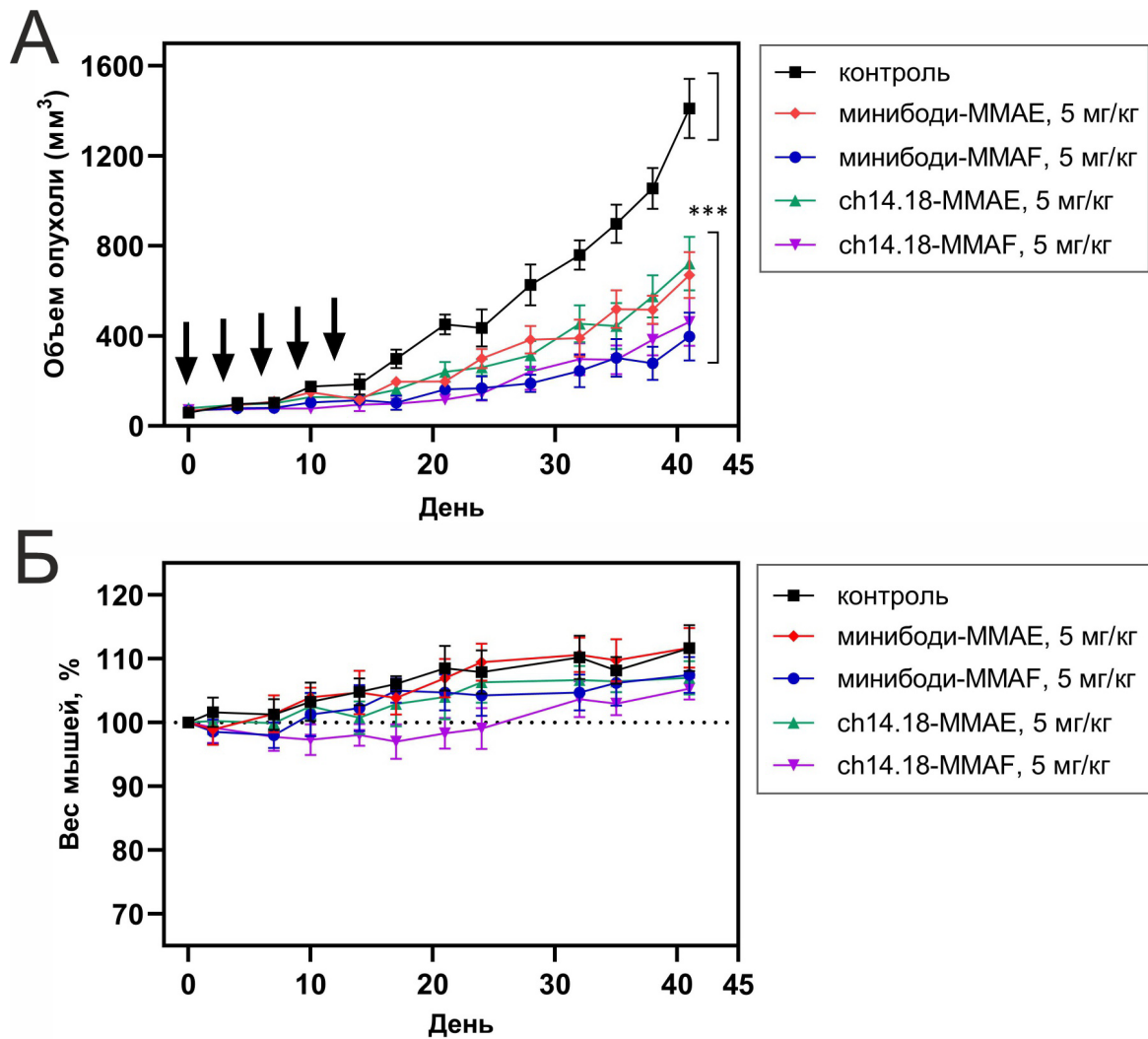


Рисунок 3.22. Противоопухолевая активность конъюгатов минибоди и антитела ch14.18 с лекарствами MMAE и MMAF в мышинной модели GD2-положительной меланомы B78-D14. **А.** Кривые динамики роста опухолей в самках мышей линии C57BL/6. К концу эксперимента (день 41 анализа), при достижении опухолями контрольной группы объема $1411 \pm 131 \text{ мм}^3$, объем опухолей в экспериментальных группах составил, в порядке уменьшения средних размеров, $721 \pm 119 \text{ мм}^3$ для группы ch14.18-MMAE, $671 \pm 103 \text{ мм}^3$ для группы минибоди-MMAE, $463 \pm 107 \text{ мм}^3$ для группы ch14.18-MMAF и $398 \pm 106 \text{ мм}^3$ для группы минибоди-MMAF. ***, $P < 0.001$ 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.

Конъюгаты 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 по сравнению с группой контроля. 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 ($p > 0.05$ между парами, двухфакторный

ANOVA с post hoc тестом Тьюки). К концу эксперимента, коэффициент относительного торможения роста опухолей (% ТРО) в сравнении с группой контроля составил 51% для группы ch14.18-ММАЕ, 55% для группы минибоди-ММАЕ, 70% для группы ch14.18-ММАF и 74% для группы минибоди-ММАF.

Конъюгат минибоди-ММАF продемонстрировал несколько более выраженную активность по сравнению с минибоди-ММАЕ, и аналогичная ситуация наблюдалась для ADC, несущих ММАF и ММАЕ, 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 3.22, 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 ММАЕ либо ММАF, 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).

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 низкие значения IC₅₀, описаны в литературе для ряда FDC при их сравнении с ADC аналогичной специфичности, в частности при применении повышенных доз или увеличенной частоты введения [308, 307, 290]. Хотя эскалация дозы для конъюгатов минибоди с лекарствами не проводилась в рамках данной работы, результаты фармакокинетического анализа форматов минибоди и антитела ch14.18 позволяют предположить, что терапевтическое окно для анти-GD2 FDC на основе минибоди 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 [415], а потенциальное использование ADC у педиатрических пациентов может быть сопряжено с риском низкой переносимости препарата [331].

Несмотря на сильное ингибирование роста опухолей под действием как GD2-специфичных ADC, так и FDC, ни один из препаратов не привел к полной регрессии опухолей в используемой мышинной модели рака. Причины неполной эффективности терапии могут вытекать из особенностей комплексного взаимодействия интактной иммунной системы мышей и иммунологически «холодной» меланомы B78-D14. Сингенные опухоли мышей часто характеризуются агрессивным ростом. Эти опухоли представляют из себя органоподобные структуры, состоящие не только из злокачественных клеток, но и из плотной стромы и иммунных клеток, которые могут препятствовать доставке лекарств и способствовать устойчивости опухолей к терапии [251]. В ряде работ [416, 339, 417] показано, что меланома B78-D14, как и её родительская линия B16, характеризуется низкой иммуногенностью и относится к функционально «холодным» опухолям. Для нее характерны низкий уровень инфильтрации иммунными клетками и отсутствие ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета PD-1 и CTLA-4. Ее исходное опухолевое микроокружение отличается минимальной инфильтрацией CD8⁺ Т-лимфоцитами, незначительным присутствием дендритных клеток и высоким содержанием регуляторных Т-клеток, что в совокупности формирует иммуносупрессивный фенотип [418]. В наших экспериментах, родительское антитело ch14.18, обладающее потенциалом для индукции гибели клеток по механизмам ADCC и CMC, не показало статистически значимого ингибирования роста опухолей в дозировках 5 и 10 мг/кг (**рисунки 3.20, А и 3.21, А, соответственно**), и это косвенно указывает на то, что активность эффекторных иммунных клеток в опухолевом микроокружении низка. В таком микроокружении даже гибель опухолевых клеток под действием высокотоксичных лекарств в составе анти-GD2 ADC / FDC может быть недостаточна для запуска эффективного противоопухолевого иммунного ответа.

Высокая иммуногенность самих конъюгатов может также служить причиной их сниженной терапевтической активности. Для различных антител, а также для их конъюгатов с лекарствами показано формирование анти-лекарственных антител (ADA, anti-drug antibodies), которые могут приводить к повышенному выведению препаратов из циркуляции, а также их нейтрализации – предотвращению их связывания с таргетным антигеном, особенно при многократном введении [419]. Формирование ADA в ответ на вводимые отдельно низкомолекулярные лекарства встречается редко, однако эти лекарства могут выступать в качестве гаптенов в конъюгатах с антителами. В работе нашей лаборатории нейтрализующие антитела, специфичные как к химерному антителу ch14.18, так и к MMAE/MMAF, были детектированы методом ИФА в сыворотках нескольких мышей после терапии GD2-специфичными ADC (данные не представлены). Вместе с тем, ряд клинических исследований конъюгатов антител различной специфичности с MMAE показал, что они не вызывали увеличения частоты образования ADA по

сравнению с титрами, которые обычно наблюдаются для моноклональных антител [420, 421]. Еще одним механизмом лекарственной резистентности может служить приобретенная в ходе терапии антигенная гетерогенность. В наших экспериментах уменьшение уровня экспрессии ганглиозида GD2 было зафиксировано в клетках линии B78-D14, выделенных из опухолей мышей после курса лечения анти-GD2 конъюгатами.

3.9. Индукция противоопухолевого иммунитета 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 [202, 203]. Низкая иммуногенность GD2-положительной меланомы B78-D14 делает ее интересной моделью для изучения потенциала противоопухолевых препаратов индуцировать противоопухолевый иммунный ответ [422, 339]. Схожие иммунологические характеристики демонстрируют многие GD2-экспрессирующие опухоли человека, и прежде всего нейроblastoma высокого риска, которая характеризуется низкой мутационной нагрузкой и иммуносупрессивным опухолевым микроокружением [423, 424]. 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 [204, 207] 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 ADC 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 3.23, 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 обработанными ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF, а также в группах положительных контролей (клетки пред-инкубированные с доксорубицином либо с конъюгатом ch14.18 и альдоксорубицина,

полученным в **главе 3.1**) наблюдалась задержка формирования опухолей по сравнению с негативным контролем. В качестве отрицательного 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 анализируемых препаратов (группы 3-6 на **рисунке 3.23, Б**) мыши без опухолей присутствовали вплоть до 20-25 дня.

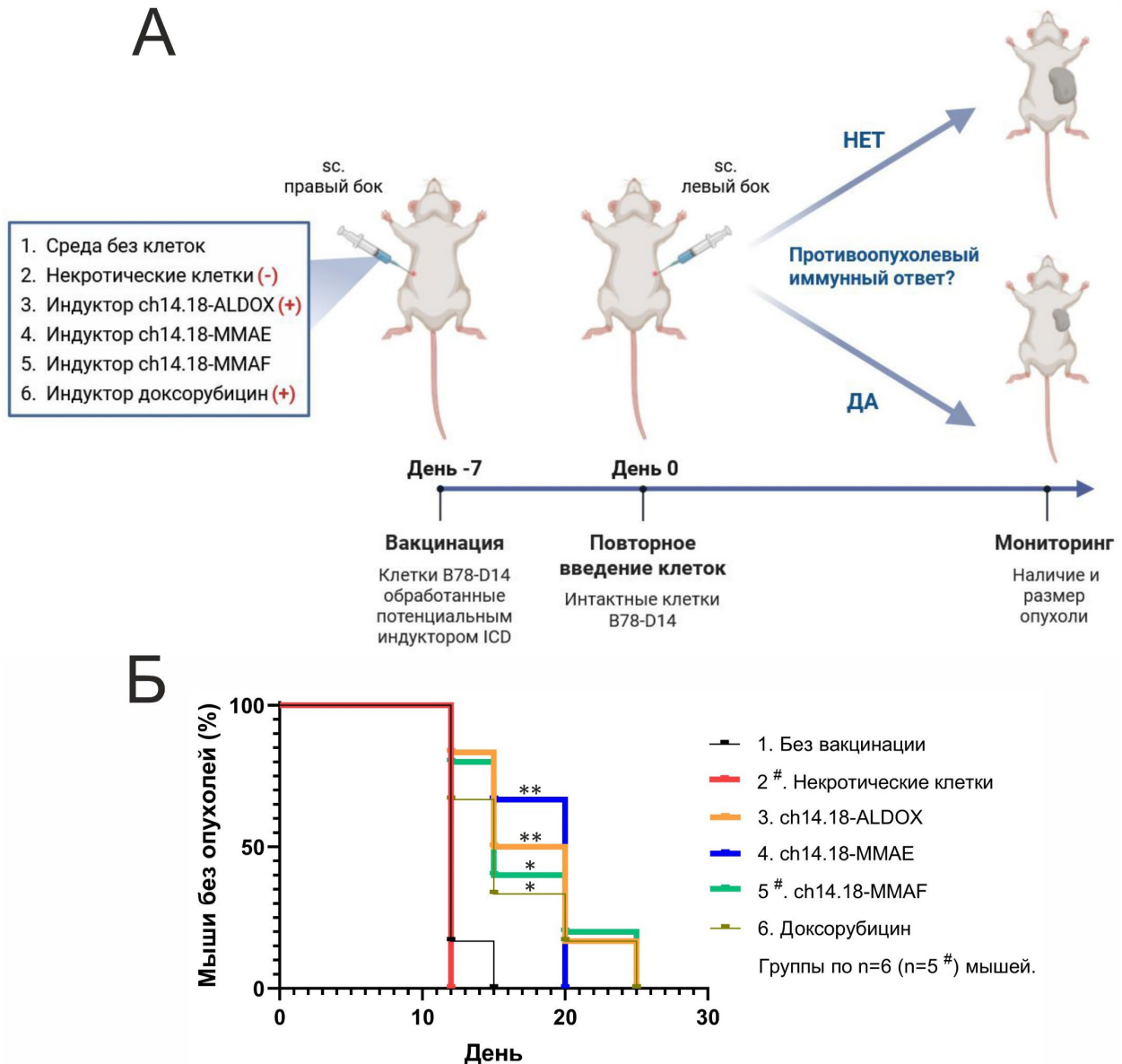


Рисунок 3.23. Индукция противоопухолевого иммунного ответа в ходе вакцинации клетками меланомы B78-D14, пред-инкубированными с GD2-специфичными ADC. А. Схема эксперимента. Б. Доля мышей без опухолей. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ – в сравнении с группой 2 (некротические клетки), лог-ранк тест.

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 отрицательного контроля (**рисунок 3.24, А**). Кроме этого, в отличие от животных группы отрицательного контроля, все опухоли которых характеризовались агрессивным ростом, ответ в группах животных, получавших конъюгаты антител с MMAE/MMAF, а также в группах положительных контролей, характеризовался высокой вариабельностью: примерно равные доли животных демонстрировали отторжение опухолей (CR, полный ответ) либо формировали крупные опухоли (**рисунок 3.24, Б-Г**). Подобная картина не является аномальной в экспериментах по вакцинации в сингенных моделях, в частности, с использованием ADC, несущих ауристатины [207].

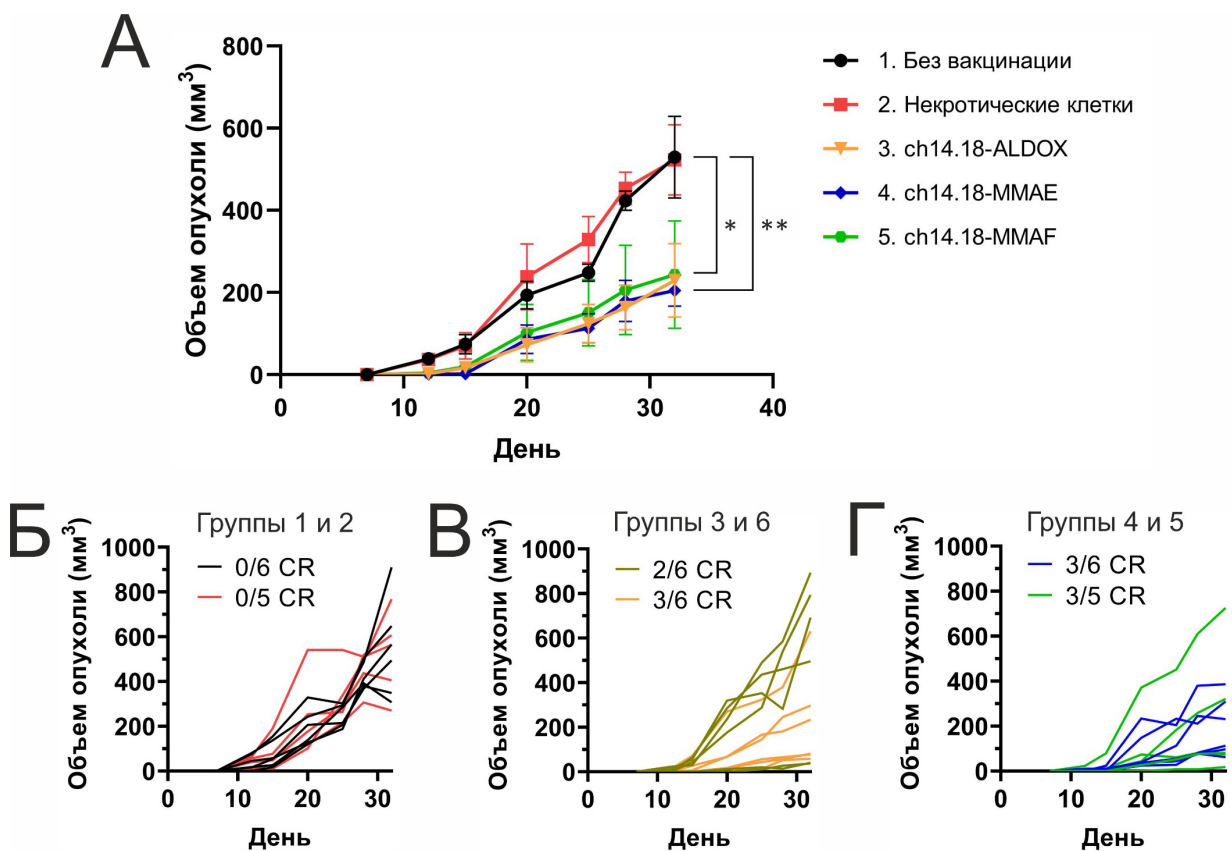


Рисунок 3.24. Индукция противоопухолевого иммунного ответа в ходе вакцинации клетками меланомы B78-D14, пред-инкубированными с GD2-специфичными ADC (продолжение). **А.** Ингибирование роста опухолей в группах под действием ADC. *, $P < 0.05$ – между группой 2 (некротические клетки) и группой 5 (ch14.18-MMAF); **, $P < 0.01$ – между группой 2 и группой 4 (ch14.18-MMAE), непарный *t*-тест. **Б-Г.** Индивидуальные кривые роста опухолей мышей: группа 1 – контроль динамики роста опухолей без вакцинации; группа 2 – вакцинация некротическими клетками (отрицательный контроль); группы 3 и 6 – вакцинация ch14.18-ALDOX и доксорубицином, соответственно (положительные контроли); группы 4 и 5 – вакцинация

ch14.18-MMAE и *ch14.18-MMAF*, соответственно. CR, *complete response* – полный ответ; принимался для мышей, объем опухолей у которых не превышал 100 мм³ к концу анализа.

Важно подчеркнуть, что инкубация клеток с индукторами ICD перед вакцинацией мышей проводилась при существенно различающихся концентрациях индукторов. В то время как концентрация доксорубина (и время инкубации с клетками) была выбрана в соответствии со стандартными протоколами, описанными в литературе, концентрации анти-GD2 ADC подбирались в соответствии с их сравнительной цитотоксической активностью *in vitro*. Таким образом, наблюдаемые эффекты в группах конъюгатов антител с ауристатинами MMAE и MMAF вызваны в десятки раз более низкими концентрациями препаратов, нежели в случае антрациклинов (50 нМ для *ch14.18-MMAE* и *ch14.18-MMAF*, 1 мкМ для *ch14.18-ALDOX*, 2 мкМ для доксорубина).

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. Релевантный к нашей работе пример комбинированной терапии в мышинной модели меланомы B78-D14 был продемонстрирован при сочетании лучевой терапии и интратуморального введения анти-GD2 иммуноцитокина hu14.18-IL2, что показало значительно более высокую эффективность по сравнению с каждым из подходов в отдельности [339]; в этой схеме лучевая терапия выступала в роли индуктора ICD [425], а иммуноцитокин стимулировал последующий иммунный ответ. Аналогичным образом, включение полученных в работе анти-GD2 ADC в схемы комбинированной терапии с другими подходами может позволить усилить уже имеющийся противоопухолевый иммунный ответ.

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-ММАЕ и минибоди-ММАF приводит к значительному ингибированию роста опухолей, эквивалентному эффектам соответствующих полноразмерных ADC ch14.18-ММАЕ и ch14.18-ММАF, 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 сокращений.

ADA – анти-лекарственные антитела

ADC – конъюгат антитела с лекарством (antibody-drug conjugate)

ADCC – антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность

ADCP – антитело-зависимый клеточный фагоцитоз

BiTE – биспецифичный активатор Т-клеток

CAR – химерный антигенный рецептор

CMC – комплемент-опосредованная цитотоксичность

CНО – линия клеток яичников китайского хомячка

DAMP – молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждением

ECM – внеклеточный матрикс

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

EMA – Европейское агентство лекарственных средств

EMT – эпителиально-мезенхимальный переход

FAK – киназа фокальных контактов

FBS – фетальная бычья сыворотка

FDA – управление по контролю за продуктами и лекарствами США

FDC – конъюгат фрагмента антитела с лекарством (fragment-drug conjugate)

FcγR – активирующие Fcγ-рецепторы иммунных клеток

FcRn – неонатальный Fc-рецептор

НС – хроматография гидрофобных взаимодействий

HRP – пероксидаза хрена

ICD – иммуногенная клеточная гибель

ID/g – введенная доза в пересчете на грамм типа ткани

ISAC – конъюгат антитела с иммуностимулирующим агентом

PBS – фосфатно-солевой буфер

PBS-T – PBS с добавлением Tween-20

PEG4 – тетравалентный ПЭГ-малеимид с молекулярной массой 10 кДа

PRR – паттерн-распознающий рецептор

sdAb – однодоменное антитело

SDS – додецилсульфат натрия

TBR – соотношение «опухоль/кровь»

TCE – антитело активатор Т-клеток

TCEP – трис(2-карбокsetил)фосфин гидрохлорид

TCR – Т-клеточный рецептор

TNF – тетрагидрофуран

TLR – Toll-подобный рецептор

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан

RFI – относительная интенсивность флуоресценции

SEM – стандартная ошибка среднего

VНН – однодоменное антитело семейства верблюдовых

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

мАт – моноклональное антитело

МНН – международное непатентованное название

МРЛ – мелкоклеточный рак легкого

о.е. – относительные единицы оптической плотности

ПЭГ (PEG) – полиэтиленгликоль (polyethylene glycol)

РЗН – Росздравнадзор

РМЖ – рак молочной железы

СВЦ – синдром высвобождения цитокинов

ТНРМЖ – трижды негативный рак молочной железы

ТРО – коэффициент торможения роста опухолей

ЦНС – центральная нервная система

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, с.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН Холоденко Роману Васильевичу, за неоценимую помощь в реализации данной работы на всех ее этапах.

Автор очень признателен научному консультанту работы, заведующему лабораторией молекулярной иммунологии ИБХ РАН Дееву Сергею Михайловичу за ценные замечания по ходу работы и за создание благоприятных условий для научных исследований. Автор выражает особую благодарность Свирцевской Елене Викторовне за обучение и помощь в работе с лабораторными животными. Автор также хотел бы поблагодарить коллектив лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН за разнообразную помощь при проведении исследований. Автор признателен Рязанцеву Дмитрию Юрьевичу за ценные методические советы по вопросам анализа белков, а также Гуляку Евгению Леонидовичу, Сапожниковой Ксении Андреевне и Алферовой Вере Александровне за помощь в проведении хроматографии гидрофобных взаимодействий.

Список литературы.

- 1 Nong J, Su C, Li C, Wang C, Li W, Li Y, Chen P, Li Y, Li Z, She X, Yuan Z, Liu S, Chen C, Liao Q, Luo Y, Shi B. Global, regional, and national epidemiology of childhood neuroblastoma (1990-2021): a statistical analysis of incidence, mortality, and DALYs. *EClinicalMedicine*. 2024 Dec 6;79:102964.
2 https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=41d32fd3-6e46-435d-8253-be04c1277e0c
- 3 Park JA, Cheung NV. Targets and Antibody Formats for Immunotherapy of Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2020 Jun 1;38(16):1836-1848.
- 4 DuBois SG, Macy ME, Henderson TO. High-Risk and Relapsed Neuroblastoma: Toward More Cures and Better Outcomes. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2022 Apr;42:1-13.
- 5 Dumontet C, Reichert JM, Senter PD, Lambert JM, Beck A. Antibody-drug conjugates come of age in oncology. *Nat Rev Drug Discov*. 2023 Aug;22(8):641-661.
- 6 Wu D, Yang K, He R, Yin R, Shui L. Antibody-drug conjugates in cancer therapy: current advances and prospects for breakthroughs. *Front Cell Dev Biol*. 2025 Oct 8;13:1669592.
- 7 Deonarain MP, Yahioğlu G, Stamati I, Pomowski A, Clarke J, Edwards BM, Diez-Posada S, Stewart AC. Small-Format Drug Conjugates: A Viable Alternative to ADCs for Solid Tumours? *Antibodies (Basel)*. 2018 Mar 31;7(2):16.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 Ahmed M, Cheung NK. Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *FEBS Lett*. 2014 Jan 21;588(2):288-97.
- 11 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.
- 12 Thudichum JLW. *A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*. Bailliere, Tindall and Cox, London. 1884.
- 13 Klenk E. Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. 1942, 273, 76–86.
- 14 Svennerholm, L. Ganglioside designation. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1980, 125, 11.

- 15 Lopez PH, Schnaar RL. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Oct;19(5):549-57.
- 16 Hakomori S. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *An Acad Bras Cienc.* 2004 Sep;76(3):553-72.
- 17 Groux-Degroote S, Delannoy P. Cancer-Associated Glycosphingolipids as Tumor Markers and Targets for Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 7;22(11):6145.
- 18 Cavdarli S, Groux-Degroote S, Delannoy P. Gangliosides: The Double-Edge Sword of Neuro-Ectodermal Derived Tumors. *Biomolecules.* 2019; 9(8):311.
- 19 Stults CL, Sweeley CC, Macher BA. Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. *Methods Enzymol.* 1989;179:167-214.
- 20 Ishii A, Ikeda T, Hitoshi S, Fujimoto I, Torii T, Sakuma K, Nakakita S, Hase S, Ikenaka K. Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex. *Glycobiology.* 2007 Mar;17(3):261-76.
- 21 Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, Dohi T. DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology.* 2008 Jul;135(1):142-151.e3.
- 22 Yamashita T, Wu YP, Sandhoff R, Werth N, Mizukami H, Ellis JM, Dupree JL, Geyer R, Sandhoff K, Proia RL. Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 22;102(8):2725-30.
- 23 Ledeen RW, Wu G. Gangliosides of the nervous system. In: Sonnino S., Prinetti A., editors. *Gangliosides, Methods and Protocols.* Humana Press; New York, NY, USA: 2018. pp. 19–56.
- 24 Ruan S, Raj BK, Lloyd KO. Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells. *J Neurochem.* 1999 Feb;72(2):514-21.
- 25 Ruan S, Lloyd KO. Glycosylation pathways in the biosynthesis of gangliosides in melanoma and neuroblastoma cells, relative glycosyltransferase levels determine ganglioside patterns. *Cancer Res.* 1992, 52, 5725–5731.
- 26 Machy P, Mortier E, Birklé S. Biology of GD2 ganglioside: implications for cancer immunotherapy. *Front Pharmacol.* 2023 Aug 21;14:1249929.
- 27 Ruckhäberle E, Karn T, Rody A, Hanker L, Gätje R, Metzler D, Holtrich U, Kaufmann M. Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009 Aug;135(8):1005-13.
- 28 Lo Piccolo MS, Cheung NK, Cheung IY. GD2 synthase: a new molecular marker for detecting neuroblastoma. *Cancer.* 2001 Aug 15;92(4):924-31.

- 29 Ustjanzew A, Marini F, Wagner S, Wingerter A, Sandhoff R, Faber J, Paret C. Predicting GD2 expression across cancer types by the integration of pathway topology and transcriptome data. *Front Bioinform.* 2025 Dec 4;5:1705930.
- 30 Sorokin M, Kholodenko I, Kalinovskiy D, Shamanskaya T, Doronin I, Konovalov D, Mironov A, Kuzmin D, Nikitin D, Deyev S, Buzdin A, Kholodenko R. RNA Sequencing-Based Identification of Ganglioside GD2-Positive Cancer Phenotype. *Biomedicines.* 2020 May 30;8(6):142.
- 31 Orsi G, Barbolini M, Ficarra G, Tazzioli G, Manni P, Petrachi T, Mastrolia I, Orvieto E, Spano C, Prapa M, Kaleci S, D'Amico R, Guarneri V, Dieci MV, Cascinu S, Conte P, Piacentini F, Dominici M. GD2 expression in breast cancer. *Oncotarget.* 2017 May 9;8(19):31592-31600.
- 32 Svennerholm L, Boström K, Fredman P, Jungbjer B, Lekman A, Mansson JE, Rynmark BM. Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1214:115–123.
- 33 Hamilton WB, Helling F, Lloyd KO, Livingston PO. Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. *Int J Cancer.* 1993 Feb 20;53(4):566-73.
- 34 Dobrenkov K, Ostrovnaya I, Gu J, Cheung IY, Cheung NK. Oncotargets GD2 and GD3 are highly expressed in sarcomas of children, adolescents, and young adults. *Pediatr Blood Cancer.* 2016 Oct;63(10):1780-5.
- 35 Chantada GL, Rossi J, Casco F, Fandiño A, Scopinaro M, de Dávila MT, Abramson DH. An aggressive bone marrow evaluation including immunocytology with GD2 for advanced retinoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2006 Jun;28(6):369-73.
- 36 Arbit E, Cheung NK, Yeh SD, Daghighian F, Zhang JJ, Cordon-Cardo C, Pentlow K, Canete A, Finn R, Larson SM. Quantitative studies of monoclonal antibody targeting to disialoganglioside GD2 in human brain tumors. *Eur J Nucl Med.* 1995 May;22(5):419-26.
- 37 Cheresh DA, Rosenberg J, Mujoo K, Hirschowitz L, Reisfeld RA. Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 1986 Oct;46(10):5112-8.
- 38 Vantaku V, Donepudi SR, Ambati CR, Jin F, Putluri V, Nguyen K, Rajapakshe K, Coarfa C, Battula VL, Lotan Y, Putluri N. Expression of ganglioside GD2, reprogram the lipid metabolism and EMT phenotype in bladder cancer. *Oncotarget.* 2017 Sep 16;8(56):95620-95631.
- 39 Лупатов А.Ю., Гисина А.М., Ким Я.С., Быкасов С.А., Волченко Н.Н., Сидоров Д.В., Ярыгин К.Н., Холоденко Р.В. Экспрессия ганглиозида GD2 на клетках колоректальной аденокарциномы. *Биомедицинская химия*, 2020, 66 (1):95-99.

- 40 Battula VL, Shi Y, Evans KW, Wang RY, Spaeth EL, Jacamo RO, Guerra R, Sahin AA, Marini FC, Hortobagyi G, Mani SA, Andreeff M. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2012 Jun;122(6):2066-78.
- 41 Saraf AJ, Dickman PS, Hingorani P. Disialoganglioside GD2 expression in pediatric rhabdomyosarcoma: A case series and review of the literature. *J Pediatr. Hematol. Oncol.* 2019, 41, 118–120.
- 42 Terzic T, Cordeau M, Herblot S, Teira P, Cournoyer S, Beaunoyer M, Peuchmaur M, Duval M, Sartelet H. Expression of disialoganglioside (GD2) in neuroblastic tumors: a prognostic value for patients treated with anti-GD2 immunotherapy. *Pediatr Dev Pathol.* 2018;21(4):355-362.
- 43 Hung JT, Yu AL. GD2-Targeted Immunotherapy of Neuroblastoma. In: *Neuroblastoma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Interventions.* Academic Press (Elsevier); 2019. p. 63-78.
- 44 Terme M, Dorvillius M, Cochonneau D, Chaumette T, Xiao W, Diccianni MB, Barbet J, Yu AL, Paris F, Sorkin LS, Birklé S. Chimeric antibody c.8B6 to O-acetyl-GD2 mediates the same efficient anti-neuroblastoma effects as therapeutic ch14.18 antibody to GD2 without antibody induced allodynia. *PLoS One.* 2014 Feb 10;9(2):e87210.
- 45 Fleurence J, Fougeray S, Bahri M, Cochonneau D, Clémenceau B, Paris F, Heczey A, Birklé S. Targeting O-Acetyl-GD2 Ganglioside for Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res.* 2017;2017:5604891.
- 46 Alvarez-Rueda N, Desselle A, Cochonneau D, Chaumette T, Clemenceau B, Leprieur S, Bougras G, Supiot S, Mussini JM, Barbet J, Saba J, Paris F, Aubry J, Birklé S. A monoclonal antibody to O-acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One.* 2011;6(9):e25220
- 47 Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, Naranjo A, Diccianni MB, Gan J, Hank JA, Batova A, London WB, Tenney SC, Smith M, Shulkin BL, Parisi M, Matthay KK, Cohn SL, Maris JM, Bagatell R, Park JR, Sondel PM. Long-Term Follow-up of a Phase III Study of ch14.18 (Dinutuximab) + Cytokine Immunotherapy in Children with High-Risk Neuroblastoma: COG Study ANBL0032. *Clin Cancer Res.* 2021 Apr 15;27(8):2179-2189.
- 48 Balis FM, Busch CM, Desai AV, Hibbitts E, Naranjo A, Bagatell R, Irwin M, Fox E. The ganglioside GD2 as a circulating tumor biomarker for neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2020 Jan;67(1):e28031.
- 49 Valentino L, Moss T, Olson E, Wang HJ, Elashoff R, Ladisch S. Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. *Blood.* 1990 Apr 1;75(7):1564-7.
- 50 Irwin MS, Naranjo A, Zhang FF, Cohn SL, London WB, Gastier-Foster JM, Ramirez NC, Pfau R, Reshmi S, Wagner E, Nuchtern J, Asgharzadeh S, Shimada H, Maris JM, Bagatell R, Park JR, Hogarty MD. Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2021 Oct 10;39(29):3229-3241.

51 Krystal J, Foster JH. Treatment of High-Risk Neuroblastoma. *Children (Basel)*. 2023 Jul 28;10(8):1302.

52 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.

53 Lietha D, Izard T. Roles of Membrane Domains in Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(15):5531.

54 Julien S, Bobowski M, Steenackers A, Le Bourhis X, Delannoy P. How Do Gangliosides Regulate RTKs Signaling? *Cells*. 2013 Dec 6;2(4):751-67.

55 Furukawa K, Ohmi Y, Hamamura K, Ohkawa Y, Hashimoto N, Tajima O, Kaneko K, Furukawa K. GD2 is a Crucial Ganglioside in the Signal Modulation and Application as a Target of Cancer Therapeutics. *Cancer Sci*. 2025 Apr;116(4):862-870.

56 Иванов Н.С., Холоденко Р.В., Качанов Д.Ю., Ларин С.С., Моллаев М.Д., Шаманская Т.В. Роль ганглиозидов в модуляции канцерогенеза. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2022, 21(2):157-166.

57 Yoshida S, Fukumoto S, Kawaguchi H, Sato S, Ueda R, Furukawa K. Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):4244-52.

58 Cheresh DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Biol*. 1986 Mar;102(3):688-96.

59 Cheresh DA, Harper JR, Schulz G, Reisfeld RA. Localization of the gangliosides GD2 and GD3 in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Sep;81(18):5767-71.

60 Aixinjueluo W, Furukawa K, Zhang Q, Hamamura K, Tokuda N, Yoshida S, Ueda R, Furukawa K. Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis. *J Biol Chem*. 2005 Aug 19;280(33):29828-36.

61 Shibuya H, Hamamura K, Hotta H, Matsumoto Y, Nishida Y, Hattori H, Furukawa K, Ueda M, Furukawa K. Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci*. 2012 Sep;103(9):1656-64.

62 Okada M, Itoh Mi M, Haraguchi M, Okajima T, Inoue M, Oishi H, Matsuda Y, Iwamoto T, Kawano T, Fukumoto S, Miyazaki H, Furukawa K, Aizawa S, Furukawa K. b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1633-6.

- 63 Iwasawa T, Zhang P, Ohkawa Y, Momota H, Wakabayashi T, Ohmi Y, Bhuiyan RH, Furukawa K, Furukawa K. Enhancement of malignant properties of human glioma cells by ganglioside GD3/GD2. *Int J Oncol*. 2018 Apr;52(4):1255-1266.
- 64 Liu B, Wu Y, Zhou Y, Peng D. Endothelin A receptor antagonism enhances inhibitory effects of anti-ganglioside GD2 monoclonal antibody on invasiveness and viability of human osteosarcoma cells. *PLoS One*. 2014 Apr 11;9(4):e93576.
- 65 Nguyen K, Yan Y, Yuan B, Dasgupta A, Sun J, Mu H, Do KA, Ueno NT, Andreeff M, Battula VL. ST8SIA1 Regulates Tumor Growth and Metastasis in TNBC by Activating the FAK-AKT-mTOR Signaling Pathway. *Mol Cancer Ther*. 2018 Dec;17(12):2689-2701.
- 66 Yesmin F, Bhuiyan RH, Ohmi Y, Yamamoto S, Kaneko K, Ohkawa Y, Zhang P, Hamamura K, Cheung NV, Kotani N, Honke K, Okajima T, Kambe M, Tajima O, Furukawa K, Furukawa K. Ganglioside GD2 Enhances the Malignant Phenotypes of Melanoma Cells by Cooperating with Integrins. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 31;23(1):423.
- 67 Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, Honke K. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 27;105(21):7405-9.
- 68 Ohmi Y, Kambe M, Ohkawa Y, Hamamura K, Tajima O, Takeuchi R, Furukawa K, Furukawa K. Differential roles of gangliosides in malignant properties of melanomas. *PLoS One*. 2018 Nov 21;13(11):e0206881.
- 69 Cazet A, Lefebvre J, Adriaenssens E, Julien S, Bobowski M, Grigoriadis A, Tutt A, Tulasne D, Le Bourhis X, Delannoy P. GD₃ synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. *Mol Cancer Res*. 2010 Nov;8(11):1526-35.
- 70 Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, Lefebvre J, Steenackers A, Popa I, Guerardel Y, Le Bourhis X, Tulasne D, Delannoy P. The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. *Glycobiology*. 2012 Jun;22(6):806-16.
- 71 Wang J, Yu RK. Interaction of ganglioside GD3 with an EGF receptor sustains the self-renewal ability of mouse neural stem cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 19;110(47):19137-42.
- 72 Yeh SC, Wang PY, Lou YW, Khoo KH, Hsiao M, Hsu TL, Wong CH. Glycolipid GD3 and GD3 synthase are key drivers for glioblastoma stem cells and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 May 17;113(20):5592-7.
- 73 Liang YJ, Wang CY, Wang IA, Chen YW, Li LT, Lin CY, Ho MY, Chou TL, Wang YH, Chiou SP, Lin YJ, Yu J. Interaction of glycosphingolipids GD3 and GD2 with growth factor receptors maintains breast cancer stem cell phenotype. *Oncotarget*. 2017 Jul 18;8(29):47454-47473.
- 74 Miljan EA, Meuillet EJ, Mania-Farnell B, George D, Yamamoto H, Simon HG, Bremer EG. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem*. 2002 Mar 22;277(12):10108-13.

75 Kawashima N, Yoon SJ, Itoh K, Nakayama K. Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor is regulated by GM3 binding through carbohydrate to carbohydrate interactions. *J Biol Chem.* 2009 Mar 6;284(10):6147-55.

76 Schnaar RL. Gangliosides as Siglec ligands. *Glycoconj J.* 2023 Apr;40(2):159-167.

77 Jandus C, Boligan KF, Chijioke O, Liu H, Dahlhaus M, Démoulin T, Schneider C, Wehrli M, Hunger RE, Baerlocher GM, Simon HU, Romero P, Münz C, von Gunten S. Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. *J Clin Invest.* 2014 Apr;124(4):1810-20.

78 Theruvath J, Menard M, Smith BAH, Linde MH, Coles GL, Dalton GN, Wu W, Kiru L, Delaidelli A, Sotillo E, Silberstein JL, Geraghty AC, Banuelos A, Radosevich MT, Dhingra S, Heitzeneder S, Tousley A, Lattin J, Xu P, Huang J, Nasholm N, He A, Kuo TC, Sangalang ERB, Pons J, Barkal A, Brewer RE, Marjon KD, Vilches-Moure JG, Marshall PL, Fernandes R, Monje M, Cochran JR, Sorensen PH, Daldrup-Link HE, Weissman IL, Sage J, Majeti R, Bertozzi CR, Weiss WA, Mackall CL, Majzner RG. Anti-GD2 synergizes with CD47 blockade to mediate tumor eradication. *Nat Med.* 2022 Feb;28(2):333-344.

79 Wilde L, Kasner M. Targeting CD47: many misses; hopeful for a hit. *Blood.* 2025 Jan 30;145(5):460-462.

80 Crescioli S, Kaplon H, Wang L, Visweswaraiiah J, Kapoor V, Reichert JM. Antibodies to watch in 2025. *MAbs.* 2025 Dec;17(1):2443538.

81 Delgado M, Garcia-Sanz JA. Therapeutic Monoclonal Antibodies against Cancer: Present and Future. *Cells.* 2023 Dec 14;12(24):2837.

82 Janeway C, Travers P. *Immunobiology.* 3rd ed. London: Current Biology; 1997.

83 Burmester GR, Pezzutto A. *Color Atlas of Immunology.* Thieme. 2003.

84 Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:520.

85 Plomp R, Dekkers G, Rombouts Y, Visser R, Koeleman CA, Kammeijer GS, Jansen BC, Rispens T, Hensbergen PJ, Vidarsson G, Wuhrer M. Hinge-Region O-Glycosylation of Human Immunoglobulin G3 (IgG3). *Mol Cell Proteomics.* 2015 May;14(5):1373-84.

86 Yu J, Song Y, Tian W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *J Hematol Oncol.* 2020 May 5;13(1):45.

87 Lucas AT, Price LSL, Schorzman AN, Storrie M, Piscitelli JA, Razo J, Zamboni WC. Factors Affecting the Pharmacology of Antibody-Drug Conjugates. *Antibodies (Basel).* 2018 Feb 7;7(1):10.

88 Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Apr;9(4):325-38.

- 89 Frenzel A, Schirrmann T, Hust M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *MAbs*. 2016 Oct;8(7):1177-1194.
- 90 Jakobovits A, Amado RG, Yang X, Roskos L, Schwab G. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol*. 2007 Oct;25(10):1134-43.
- 91 Toledo-Stuardo K, Ribeiro CH, González-Herrera F, Matthies DJ, Le Roy MS, Dietz-Vargas C, Latorre Y, Campos I, Guerra Y, Tello S, Vásquez-Sáez V, Novoa P, Fehring N, González M, Rodríguez-Siza J, Vásquez G, Méndez P, Altamirano C, Molina MC. Therapeutic antibodies in oncology: an immunopharmacological overview. *Cancer Immunol Immunother*. 2024 Oct 3;73(12):242.
- 92 Weiner GJ. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jun;15(6):361-70.
- 93 Bowles JA, Weiner GJ. CD16 polymorphisms and NK activation induced by monoclonal antibody-coated target cells. *J Immunol Methods*. 2005 Sep;304(1-2):88-99.
- 94 Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):754-8.
- 95 Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 1;21(21):3940-7.
- 96 Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, Lamy A, Penault-Llorca F, Frébourg T, Michel P, Sabourin JC, Boissière-Michot F. Impact of FcγRIIa–FcγRIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1;27(7):1122-9.
- 97 Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 10;26(11):1789-96.
- 98 Baeuerle PA, Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res*. 2009 Jun 15;69(12):4941-4.
- 99 Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*. 2005 Sep;23(9):1147-57.
- 100 Lee SC, Srivastava RM, López-Albaitero A, Ferrone S, Ferris RL. Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunol Res*. 2011 Aug;50(2-3):248-54.

101 Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2003. 278: p. 3466–3473.

102 Kubota T. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci.* 2009. 100: p. 1566–1572.

103 Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Brünker P, Waldhauer I, Hennig M, Ruf A, Rufer AC, Stihle M, Umaña P, Benz J. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 2;108(31):12669-74.

104 Flexner S, Noguchi H. Snake venom in relation to haemolysis, bacteriolysis, and toxicity. *J Exp Med.* 1902 Mar 1;6(3):277-301.

105 Wang SY, Weiner G. Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Jun;8(6):759-68.

106 Pawluczko AW, Beurskens FJ, Beum PV, Lindorfer MA, van de Winkel JG, Parren PW, Taylor RP. Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. *J Immunol.* 2009 Jul 1;183(1):749-58.

107 Wang SY, Veeramani S, Racila E, Cagley J, Fritzinger DC, Vogel CW, St John W, Weiner GJ. Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood.* 2009 Dec 17;114(26):5322-30.

108 Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, Rambaldi A, Intra M. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood.* 2001 Dec 1;98(12):3383-9.

109 Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, Botto M, Intra M, Golay J. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol.* 2003 Aug 1;171(3):1581-7.

110 Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, van Meerten T, Ebeling S, Vink T, Slootstra JW, Parren PW, Glennie MJ, van de Winkel JG. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol.* 2006 Jul 1;177(1):362-71.

111 Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, Shimada K, Chan CH, Tutt A, Beers SA, Glennie MJ, Cragg MS, Illidge TM. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody

(GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood*. 2011 Apr 28;117(17):4519-29.

112 Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*. 2012 Jul 12;12(8):553-63.

113 Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019 Mar 7;176(6):1248-1264.

114 Drago JZ, Ferraro E, Abuhadra N, Modi S. Beyond HER2: Targeting the ErbB receptor family in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2022 Sep;109:102436.

115 Britsch S. The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2007;190:1-65.

116 Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control*. 2007 Jul;14(3):295-304.

117 Swain SM, Shastry M, Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov*. 2023 Feb;22(2):101-126.

118 Tsao LC, Crosby EJ, Trotter TN, Wei J, Wang T, Yang X, Summers AN, Lei G, Rabiola CA, Chodosh LA, Muller WJ, Lyerly HK, Hartman ZC. Trastuzumab/pertuzumab combination therapy stimulates antitumor responses through complement-dependent cytotoxicity and phagocytosis. *JCI Insight*. 2022 Mar 22;7(6):e155636.

119 Yagolovich AV, Gasparian ME, Isakova AA, Artykov AA, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP. Cytokine TRAIL death receptor agonists: design strategies and clinical prospects. *Russ Chem Rev*. 2025;94(2):RCR5154.

120 Montinaro A, Walczak H. Harnessing TRAIL-induced cell death for cancer therapy: a long walk with thrilling discoveries. *Cell Death Differ*. 2023 Feb;30(2):237-249.

121 Klebanoff CA, Chandran SS, Baker BM, Quezada SA, Ribas A. T cell receptor therapeutics: immunological targeting of the intracellular cancer proteome. *Nat Rev Drug Discov*. 2023 Dec;22(12):996-1017.

122 He Q, Liu Z, Liu Z, Lai Y, Zhou X, Weng J. TCR-like antibodies in cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2019 Sep 14;12(1):99.

123 Minikel EV, Painter JL, Dong CC, Nelson MR. Refining the impact of genetic evidence on clinical success. *Nature*. 2024 May;629(8012):624-629.

124 Hale G. Living in LALA land? Forty years of attenuating Fc effector functions. *Immunol Rev*. 2024 Nov;328(1):422-437.

125 Kim J, McFee M, Fang Q, Abdin O, Kim PM. Computational and artificial intelligence-based methods for antibody development. *Trends Pharmacol Sci*. 2023 Mar;44(3):175-189.

126 Sobhani N, D'Angelo A, Pittacolo M, Mondani G, Generali D. Future AI Will Most Likely Predict Antibody-Drug Conjugate Response in Oncology: A Review and Expert Opinion. *Cancers (Basel)*. 2024 Sep 5;16(17):3089.

127 Kirschenbaum D, Xie K, Ingelfinger F, Katzenelenbogen Y, Abadie K, Look T, Sheban F, Phan TS, Li B, Zwicky P, Yofe I, David E, Mazuz K, Hou J, Chen Y, Shaim H, Shanley M, Becker S, Qian J, Colonna M, Ginhoux F, Rezvani K, Theis FJ, Yosef N, Weiss T, Weiner A, Amit I. Time-resolved single-cell transcriptomics defines immune trajectories in glioblastoma. *Cell*. 2024 Jan 4;187(1):149-165.e23.

128 Aung TN, Monkman J, Warrell J, Vathiotis I, Bates KM, Gavrielatou N, Trontzas IP, Tan CW, Fernandez AI, Moutafi M, O' Byrne K, Schalper KA, Syrigos K, Herbst RS, Kulasinghe A, Rimm DL. Spatial signatures for predicting immunotherapy outcomes using multi-omics in non-small cell lung cancer. *Nat Genet*. 2025 Oct;57(10):2482-2493.

129 Liu W, Puri A, Fu D, Chen L, Wang C, Kellis M, Yang J. Dissecting the tumor microenvironment in response to immune checkpoint inhibitors via single-cell and spatial transcriptomics. *Clin Exp Metastasis*. 2024 Aug;41(4):313-332.

130 Albayrak G, Wan PK, Fisher K, Seymour LW. T cell engagers: expanding horizons in oncology and beyond. *Br J Cancer*. 2025 Nov;133(9):1241-1249.

131 Autio KA, Boni V, Humphrey RW, Naing A. Probody Therapeutics: An Emerging Class of Therapies Designed to Enhance On-Target Effects with Reduced Off-Tumor Toxicity for Use in Immuno-Oncology. *Clin Cancer Res*. 2020 Mar 1;26(5):984-989.

132 van der Neut Kolfshoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martínez-Martínez P, Vermeulen E, den Bleker TH, Wiegman L, Vink T, Aarden LA, De Baets MH, van de Winkel JG, Aalberse RC, Parren PW. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*. 2007 Sep 14;317(5844):1554-7.

133 Labrijn AF, Buijsse AO, van den Bremer ET, Verwilligen AY, Bleeker WK, Thorpe SJ, Killestein J, Polman CH, Aalberse RC, Schuurman J, van de Winkel JG, Parren PW. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol*. 2009 Aug;27(8):767-71.

134 Sasso JM, Tenchov R, Bird R, Iyer KA, Ralhan K, Rodriguez Y, Zhou QA. The Evolving Landscape of Antibody-Drug Conjugates: In Depth Analysis of Recent Research Progress. *Bioconjug Chem*. 2023 Nov 15;34(11):1951-2000.

135 Gorovits B, Krinos-Fiorotti C. Proposed mechanism of off-target toxicity for antibody-drug conjugates driven by mannose receptor uptake. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 Feb;62(2):217-23.

136 Chalouni C, Doll S. Fate of Antibody-Drug Conjugates in Cancer Cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Feb 6;37(1):20.

- 137 Макарова А.О., Титов М.М., Калиновский Д.В., Холоденко И.В., Кибардин А.В., Ларин С.С., Свирщевская Е.В., Деев С.М., Холоденко Р.В. Особенности эндоцитоза GD2-специфичных антител разных форматов в опухолевых клетках. *Биохимия*, 2025, 90(3): 471-484.
- 138 Polson AG, Williams M, Gray AM, Fuji RN, Poon KA, McBride J, Raab H, Januario T, Go M, Lau J, Yu SF, Du C, Fuh F, Tan C, Wu Y, Liang WC, Prabhu S, Stephan JP, Hongo JA, Dere RC, Deng R, Cullen M, de Tute R, Bennett F, Rawstron A, Jack A, Ebens A. Anti-CD22-MCC-DM1: an antibody-drug conjugate with a stable linker for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2010 Sep;24(9):1566-73.
- 139 Tsuchikama K, An Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell*. 2018 Jan;9(1):33-46.
- 140 Chari RV, Miller ML, Widdison WC. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014 Apr 7;53(15):3796-827.
- 141 Staudacher AH, Brown MP. Antibody drug conjugates and bystander killing: is antigen-dependent internalisation required? *Br J Cancer*. 2017 Dec 5;117(12):1736-1742.
- 142 Baah S, Laws M, Rahman KM. Antibody-Drug Conjugates-A Tutorial Review. *Molecules*. 2021 May 15;26(10):2943.
- 143 Norsworthy KJ, Ko CW, Lee JE, Liu J, John CS, Przepiorcka D, Farrell AT, Pazdur R. FDA Approval Summary: Mylotarg for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Oncologist*. 2018 Sep;23(9):1103-1108.
- 144 Kellogg BA, Garrett L, Kovtun Y, Lai KC, Leece B, Miller M, Payne G, Steeves R, Whiteman KR, Widdison W, Xie H, Singh R, Chari RV, Lambert JM, Lutz RJ. Disulfide-linked antibody-maytansinoid conjugates: optimization of in vivo activity by varying the steric hindrance at carbon atoms adjacent to the disulfide linkage. *Bioconjug Chem*. 2011 Apr 20;22(4):717-27.
- 145 Zhao H, Gulesserian S, Malinao MC, Ganesan SK, Song J, Chang MS, Williams MM, Zeng Z, Mattie M, Mendelsohn BA, Stover DR, Doñate F. A Potential Mechanism for ADC-Induced Neutropenia: Role of Neutrophils in Their Own Demise. *Mol Cancer Ther*. 2017 Sep;16(9):1866-1876.
- 146 Ha SYY, Anami Y, Yamazaki CM, Xiong W, Haase CM, Olson SD, Lee J, Ueno NT, Zhang N, An Z, Tsuchikama K. An Enzymatically Cleavable Tripeptide Linker for Maximizing the Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates. *Mol Cancer Ther*. 2022 Sep 6;21(9):1449-1461.
- 147 Sheyi R, de la Torre BG, Albericio F. Linkers: An Assurance for Controlled Delivery of Antibody-Drug Conjugate. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 11;14(2):396.
- 148 Burke PJ, Hamilton JZ, Pires TA, Lai HWH, Leiske CI, Emmerton KK, Waight AB, Senter PD, Lyon RP, Jeffrey SC. Glucuronide-Linked Antibody-Tubulysin Conjugates Display Activity in MDR+ and Heterogeneous Tumor Models. *Mol Cancer Ther*. 2018 Aug;17(8):1752-1760.

- 149 Miller JT, Vitro CN, Fang S, Benjamin SR, Tumey LN. Enzyme-Agnostic Lysosomal Screen Identifies New Legumain-Cleavable ADC Linkers. *Bioconjug Chem.* 2021 Apr 21;32(4):842-858.
- 150 Metrangolo V, Engelholm LH. Antibody-Drug Conjugates: The Dynamic Evolution from Conventional to Next-Generation Constructs. *Cancers (Basel).* 2024 Jan 20;16(2):447.
- 151 Hallam TJ, Wold E, Wahl A, Smider VV. Antibody conjugates with unnatural amino acids. *Mol Pharm.* 2015 Jun 1;12(6):1848-62.
- 152 Walsh SJ, Bargh JD, Dannheim FM, Hanby AR, Seki H, Counsell AJ, Ou X, Fowler E, Ashman N, Takada Y, Isidro-Llobet A, Parker JS, Carroll JS, Spring DR. Site-selective modification strategies in antibody-drug conjugates. *Chem Soc Rev.* 2021 Jan 21;50(2):1305-1353.
- 153 Agarwal P, Bertozzi CR. Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development. *Bioconjug Chem.* 2015 Feb 18;26(2):176-92.
- 154 McCombs JR, Owen SC. Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry. *AAPS J.* 2015 Mar;17(2):339-51.
- 155 Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, Lu Y, Meng YG, Ng C, Yang J, Lee CC, Duenas E, Gorrell J, Katta V, Kim A, McDorman K, Flagella K, Venook R, Ross S, Spencer SD, Lee Wong W, Lowman HB, Vandlen R, Sliwkowski MX, Scheller RH, Polakis P, Mallet W. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol.* 2008 Aug;26(8):925-32.
- 156 Adhikari P, Zacharias N, Ohri R, Sadowsky J. Site-Specific Conjugation to Cys-Engineered THIOMAB™ Antibodies. *Methods Mol Biol.* 2020;2078:51-69.
- 157 Kaempffe A, Dickgiesser S, Rasche N, Paoletti A, Bertotti E, De Salve I, Sirtori FR, Kellner R, Könnig D, Hecht S, Anderl J, Kolmar H, Schröter C. Effect of Conjugation Site and Technique on the Stability and Pharmacokinetics of Antibody-Drug Conjugates. *J Pharm Sci.* 2021 Dec;110(12):3776-3785.
- 158 Cao M, De Mel N, Jiao Y, Howard J, Parthemore C, Korman S, Thompson C, Wendeler M, Liu D. Site-specific antibody-drug conjugate heterogeneity characterization and heterogeneity root cause analysis. *MAbs.* 2019 Aug/Sep;11(6):1064-1076.
- 159 Fan Q, Chen H, Wei G, Wei D, Wang Z, Zhang L, Wang J, Zhu M. A review of conjugation technologies for antibody drug conjugates. *Antib Ther.* 2025 Apr 17;8(2):157-170.
- 160 Forte N, Chudasama V, Baker JR. Homogeneous antibody-drug conjugates via site-selective disulfide bridging. *Drug Discov Today Technol.* 2018 Dec;30:11-20.
- 161 Schumacher FF, Nunes JP, Maruani A, Chudasama V, Smith ME, Chester KA, Baker JR, Caddick S. Next generation maleimides enable the controlled assembly of antibody-drug conjugates via native disulfide bond bridging. *Org Biomol Chem.* 2014 Oct 7;12(37):7261-9.

162 Chudasama V, Smith ME, Schumacher FF, Papaioannou D, Waksman G, Baker JR, Caddick S. Bromopyridazinedione-mediated protein and peptide bioconjugation. *Chem Commun (Camb)*. 2011 Aug 21;47(31):8781-3.

163 Sjögren J, Lood R, Nägeli A. On enzymatic remodeling of IgG glycosylation; unique tools with broad applications. *Glycobiology*. 2020 Mar 20;30(4):254-267.

164 Dennler P, Chiotellis A, Fischer E, Brégeon D, Belmant C, Gauthier L, Lhospipe F, Romagne F, Schibli R. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates. *Bioconjug Chem*. 2014 Mar 19;25(3):569-78.

165 Dickgiesser S, Rieker M, Mueller-Pompalla D, Schröter C, Tonillo J, Warszawski S, Raab-Westphal S, Kühn S, Knehans T, Könnig D, Dotterweich J, Betz UAK, Anderl J, Hecht S, Rasche N. Site-Specific Conjugation of Native Antibodies Using Engineered Microbial Transglutaminases. *Bioconjug Chem*. 2020 Apr 15;31(4):1070-1076.

166 Sadiki A, Liu S, Vaidya SR, Kercher EM, Lang RT, McIsaac J, Spring BQ, Auclair JR, Zhou ZS. Site-Specific Conjugation of Native Antibody: Transglutaminase-Mediated Modification of a Conserved Glutamine While Maintaining the Primary Sequence and Core Fc Glycan via Trimming with an Endoglycosidase. *Bioconjug Chem*. 2024 Apr 17;35(4):465-471.

167 Beerli RR, Hell T, Merkel AS, Grawunder U. Sortase Enzyme-Mediated Generation of Site-Specifically Conjugated Antibody Drug Conjugates with High In Vitro and In Vivo Potency. *PLoS One*. 2015 Jul 1;10(7):e0131177.

168 Antos JM, Ingram J, Fang T, Pishesha N, Truttmann MC, Ploegh HL. Site-Specific Protein Labeling via Sortase-Mediated Transpeptidation. *Curr Protoc Protein Sci*. 2017 Aug 1;89:15.3.1-15.3.19.

169 de Bever L, Popal S, van Schaik J, Rubahamya B, van Delft FL, Thurber GM, van Berkel SS. Generation of DAR1 Antibody-Drug Conjugates for Ultrapotent Payloads Using Tailored GlycoConnect Technology. *Bioconjug Chem*. 2023 Mar 15;34(3):538-548.

170 Zhang X, Ou C, Liu H, Prabhu SK, Li C, Yang Q, Wang LX. General and Robust Chemoenzymatic Method for Glycan-Mediated Site-Specific Labeling and Conjugation of Antibodies: Facile Synthesis of Homogeneous Antibody-Drug Conjugates. *ACS Chem Biol*. 2021 Nov 19;16(11):2502-2514.

171 Yang Q, Liu Y. Technical, preclinical, and clinical developments of Fc-glycan-specific antibody-drug conjugates. *RSC Med Chem*. 2024 Oct 18;16(1):50-62.

172 Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 May;16(5):315-337.

173 Dean AQ, Luo S, Twomey JD, Zhang B. Targeting cancer with antibody-drug conjugates: Promises and challenges. *MAbs*. 2021 Jan-Dec;13(1):1951427.

174 Song CH, Jeong M, In H, Kim JH, Lin CW, Han KH. Trends in the Development of Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)*. 2023 Nov 3;12(4):72.

175 Best RL, LaPointe NE, Azarenko O, Miller H, Genualdi C, Chih S, Shen BQ, Jordan MA, Wilson L, Feinstein SC, Stagg NJ. Microtubule and tubulin binding and regulation of microtubule dynamics by the antibody drug conjugate (ADC) payload, monomethyl auristatin E (MMAE): Mechanistic insights into MMAE ADC peripheral neuropathy. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021 Jun 15;421:115534

176 Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, Gökbuget N, O'Brien S, Wang K, Wang T, Paccagnella ML, Sleight B, Vandendries E, Advani AS. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Aug 25;375(8):740-53.

177 Hartley JA. Antibody-drug conjugates (ADCs) delivering pyrrolobenzodiazepine (PBD) dimers for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2021 Jul;21(7):931-943.

178 Ogitani Y, Hagihara K, Oitate M, Naito H, Agatsuma T. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody-drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. *Cancer Sci*. 2016 Jul;107(7):1039-46.

179 Conilh L, Sadilkova L, Viricel W, Dumontet C. Payload diversification: a key step in the development of antibody-drug conjugates. *J Hematol Oncol*. 2023 Jan 17;16(1):3.

180 Liao D, Zhang J, Yan T, Chen Y, Fu Y, Xie N, Long M. A Systematic Review of Mechanisms, Incidence, and Management of Trastuzumab Deruxtecan Induced ILD/Pneumonitis in Solid Tumors. *Drug Des Devel Ther*. 2025 Mar 8;19:1655-1668.

181 Baba T, Kusumoto M, Kato T, Kurihara Y, Sasaki S, Oikado K, Saito Y, Endo M, Fujiwara Y, Kenmotsu H, Sata M, Takano T, Kato K, Hirata K, Katagiri T, Saito H, Kuwano K. Clinical and imaging features of interstitial lung disease in cancer patients treated with trastuzumab deruxtecan. *Int J Clin Oncol*. 2023 Dec;28(12):1585-1596.

182 Tarantino P, Modi S, Tolaney SM, Cortés J, Hamilton EP, Kim SB, Toi M, André F, Curigliano G. Interstitial Lung Disease Induced by Anti-ERBB2 Antibody-Drug Conjugates: A Review. *JAMA Oncol*. 2021 Dec 1;7(12):1873-1881.

183 Rugo HS, Tolaney SM, Loirat D, Punie K, Bardia A, Hurvitz SA, O'Shaughnessy J, Cortés J, Diéras V, Carey LA, Gianni L, Piccart MJ, Loibl S, Goldenberg DM, Hong Q, Olivo M, Itri LM, Kalinsky K. Safety analyses from the phase 3 ASCENT trial of sacituzumab govitecan in metastatic triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2022 Aug 29;8(1):98.

184 Abelman RO, Wu B, Barnes H, Medford A, Norden B, Putur A, Bitman E, Thant W, Liu T, Weipert C, Fell G, Spring LM, Wander SA, Moy B, Vidula N, Isakoff SJ, Varkaris A, Juric D, Corcoran RB, Ellisen LW, Bardia A. TOP1 Mutations and Cross-Resistance to Antibody-Drug Conjugates in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2025 May 15;31(10):1966-1974.

185 Mahalingaiah PK, Ciurlionis R, Durbin KR, Yeager RL, Philip BK, Bawa B, Mantena SR, Enright BP, Liguori MJ, Van Vleet TR. Potential mechanisms of target-independent uptake and toxicity of antibody-drug conjugates. *Pharmacol Ther.* 2019 Aug;200:110-125.

186 Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the "biological missile" for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Mar 22;7(1):93.

187 Kovtun YV, Audette CA, Ye Y, Xie H, Ruberti MF, Phinney SJ, Leece BA, Chittenden T, Blättler WA, Goldmacher VS. Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. *Cancer Res.* 2006 Mar 15;66(6):3214-21.

188 Li F, Emmerton KK, Jonas M, Zhang X, Miyamoto JB, Setter JR, Nicholas ND, Okeley NM, Lyon RP, Benjamin DR, Law CL. Intracellular Released Payload Influences Potency and Bystander-Killing Effects of Antibody-Drug Conjugates in Preclinical Models. *Cancer Res.* 2016 May 1;76(9):2710-9.

189 Ashman N, Bargh JD, Spring DR. Non-internalising antibody-drug conjugates. *Chem Soc Rev.* 2022 Nov 14;51(22):9182-9202.

190 Sloane BF, Yan S, Podgorski I, Linebaugh BE, Cher ML, Mai J, Cavallo-Medved D, Sameni M, Dosesco J, Moin K. Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2005 Apr;15(2):149-57.

191 Rothberg JM, Bailey KM, Wojtkowiak JW, Ben-Nun Y, Bogyo M, Weber E, Moin K, Blum G, Mattingly RR, Gillies RJ, Sloane BF. Acid-mediated tumor proteolysis: contribution of cysteine cathepsins. *Neoplasia.* 2013 Oct;15(10):1125-37.

192 Lam M, Lucas J, Maderna A, Wald H, Wojciechowicz M, Dushin R, Peano B, Wang F, Myers J, Tan X, Musto S, Charati M, Gerber HP, Loganzo F. Extracellular proteolytic cleavage of peptide-linked antibody-drug conjugates promotes bystander killing of cancer cells. *Cancer Res.* 2014;74(19 Suppl):Abstract 4837.

193 Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 25;92(9):3849-53.

194 Dorywalska M, Dushin R, Moine L, Farias SE, Zhou D, Navaratnam T, Lui V, Hasa-Moreno A, Casas MG, Tran TT, Delaria K, Liu SH, Foletti D, O'Donnell CJ, Pons J, Shelton DL, Rajpal A, Strop P. Molecular Basis of Valine-Citrulline-PABC Linker Instability in Site-Specific ADCs and Its Mitigation by Linker Design. *Mol Cancer Ther.* 2016 May;15(5):958-70.

195 Polson AG, Calemine-Fenaux J, Chan P, Chang W, Christensen E, Clark S, de Sauvage FJ, Eaton D, Elkins K, Elliott JM, Frantz G, Fuji RN, Gray A, Harden K, Ingle GS, Kljavin NM, Koeppen H, Nelson C, Prabhu S, Raab H, Ross S, Slaga DS, Stephan JP, Scales SJ, Spencer SD, Vandlen R, Wranik

B, Yu SF, Zheng B, Ebens A. Antibody-drug conjugates for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: target and linker-drug selection. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2358-64.

196 Tsao LC, Wang JS, Ma X, Sodhi S, Ragusa JV, Liu B, McBane J, Wang T, Wei J, Liu CX, Yang X, Lei G, Spasojevic I, Fan P, Trotter TN, Morse M, Lysterly HK, Hartman ZC. Effective extracellular payload release and immunomodulatory interactions govern the therapeutic effect of trastuzumab deruxtecan (T-DXd). *Nat Commun.* 2025 Apr 2;16(1):3167.

197 Gébleux R, Stringhini M, Casanova R, Soltermann A, Neri D. Non-internalizing antibody-drug conjugates display potent anti-cancer activity upon proteolytic release of monomethyl auristatin E in the subendothelial extracellular matrix. *Int J Cancer.* 2017 Apr 1;140(7):1670-1679.

198 Gébleux R, Wulhfard S, Casi G, Neri D. Antibody Format and Drug Release Rate Determine the Therapeutic Activity of Noninternalizing Antibody-Drug Conjugates. *Mol Cancer Ther.* 2015 Nov;14(11):2606-12.

199 Rossin R, den Brok MH, Wouters LW, Houkes J, Versteegen RM, van Stevendaal MH, Zijlmans LH, Cincotta M, Feingold JM, Kleijn LH, Robillard MS. Preclinical development of TGW101, a first in class click-cleavable ADC with MMAE against non-internalizing pan-carcinoma marker TAG72. *Cancer Res.* 2025;85(8 Suppl 1):1794.

200 Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016 May;13(5):273-90.

201 Shi R, Jia L, Lv Z, Cui J. Another power of antibody-drug conjugates: immunomodulatory effect and clinical applications. *Front Immunol.* 2025 Aug 20;16:1632705.

202 Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, Apetoh L, Aranda F, Barnaba V, Bloy N, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology.* 2014 Dec 13;3(9):e955691.

203 Galluzzi L, Vitale I, Warren S, Adjemian S, Agostinis P, Martinez AB, Chan TA, Coukos G, Demaria S, Deutsch E, et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *J Immunother Cancer.* 2020 Mar;8(1):e000337.

204 Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, Coutant F, Métivier D, Pichard E, Aucouturier P, Pierron G, Garrido C, Zitvogel L, Kroemer G. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med.* 2005 Dec 19;202(12):1691-701.

205 Müller P, Kreuzaler M, Khan T, Thommen DS, Martin K, Glatz K, Savic S, Harbeck N, Nitz U, Gluz O, von Bergwelt-Baildon M, Kreipe H, Reddy S, Christgen M, Zippelius A. Trastuzumab emtansine (T-DM1) renders HER2+ breast cancer highly susceptible to CTLA-4/PD-1 blockade. *Sci Transl Med.* 2015 Nov 25;7(315):315ra188.

206 Bauzon M, Drake PM, Barfield RM, Cornali BM, Rupniewski I, Rabuka D. Maytansine-bearing antibody-drug conjugates induce in vitro hallmarks of immunogenic cell death selectively in antigen-positive target cells. *Oncoimmunology*. 2019 Jan 22;8(4):e1565859.

207 Heiser RA, Cao AT, Zeng W, Ulrich M, Younan P, Anderson ME, Trueblood ES, Jonas M, Thurman R, Law CL, Gardai SJ. Brentuximab Vedotin-Driven Microtubule Disruption Results in Endoplasmic Reticulum Stress Leading to Immunogenic Cell Death and Antitumor Immunity. *Mol Cancer Ther*. 2024 Jan 3;23(1):68-83.

208 Pascual-Pasto G, McIntyre B, Shraim R, Buongervino SN, Erbe AK, Zhelev DV, Sadirova S, Giudice AM, Martinez D, Garcia-Gerique L, Dimitrov DS, Sondel PM, Bosse KR. GPC2 antibody-drug conjugate reprograms the neuroblastoma immune milieu to enhance macrophage-driven therapies. *J Immunother Cancer*. 2022 Dec;10(12):e004704.

209 Rios-Doria J, Harper J, Rothstein R, Wetzel L, Chesebrough J, Marrero A, Chen C, Strout P, Mulgrew K, McGlinchey K, Fleming R, Bezabeh B, Meekin J, Stewart D, Kennedy M, Martin P, Buchanan A, Dimasi N, Michelotti E, Hollingsworth R. Antibody-Drug Conjugates Bearing Pyrrolobenzodiazepine or Tubulysin Payloads Are Immunomodulatory and Synergize with Multiple Immunotherapies. *Cancer Res*. 2017 May 15;77(10):2686-2698.

210 Kepp O, Kroemer G. Immunogenic cell death and bystander killing: expanding the therapeutic potential of modern antibody-drug conjugates. *Oncoimmunology*. 2025 Dec;14(1):2533488.

211 Müller P, Martin K, Theurich S, Schreiner J, Savic S, Terszowski G, Lardinois D, Heinzelmann-Schwarz VA, Schlaak M, Kvasnicka HM, Spagnoli G, Dirnhofer S, Speiser DE, von Bergwelt-Baildon M, Zippelius A. Microtubule-depolymerizing agents used in antibody-drug conjugates induce antitumor immunity by stimulation of dendritic cells. *Cancer Immunol Res*. 2014 Aug;2(8):741-55.

212 Montes de Oca R, Alavi AS, Vitali N, Bhattacharya S, Blackwell C, Patel K, Seestaller-Wehr L, Kaczynski H, Shi H, Dobrzynski E, et al. Belantamab Mafodotin (GSK2857916) drives immunogenic cell death and immune-mediated antitumor responses in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2021;20(10):1941–1955.

213 Sommer A, Berndt S, Lerchen HG, Forveille S, Sauvat A, Mumberg D, Kroemer G, Kepp O. Antibody-drug conjugates harboring a kinesin spindle protein inhibitor with immunostimulatory properties. *Oncoimmunology*. 2022 Feb 9;11(1):2037216.

214 Forveille S, Zhao L, Sauvat A, Cerrato, G, Leduc, M, Doffe, F, Pan, Y, Liu, P, Kroemer, G, Kepp, O. Patritumab deruxtecan induces immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 2025;14(1):2514050.

215 D'Amico L, Menzel U, Prummer M, Müller P, Buchi M, Kashyap A, Haessler U, Yermanos A, Gébleux R, Briendl M, Hell T, Wolter FI, Beerli RR, Truxova I, Radek Š, Vlajnic T, Grawunder U, Reddy S, Zippelius A. A novel anti-HER2 anthracycline-based antibody-drug conjugate induces

adaptive anti-tumor immunity and potentiates PD-1 blockade in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2019 Jan 21;7(1):16.

216 Fu C, Tong W, Yu L, Miao Y, Wei Q, Yu Z, Chen B, Wei M. When will the immune-stimulating antibody conjugates (ISACs) be transferred from bench to bedside? *Pharmacol Res*. 2024 May;203:107160.

217 Rolfo C, Giovannetti E, Martinez P, McCue S, Naing A. Applications and clinical trial landscape using Toll-like receptor agonists to reduce the toll of cancer. *NPJ Precis Oncol*. 2023 Mar 8;7(1):26.

218 Ackerman SE, Pearson CI, Gregorio JD, Gonzalez JC, Kenkel JA, Hartmann FJ, Luo A, Ho PY, LeBlanc H, Blum LK, et al. Immune-stimulating antibody conjugates elicit robust myeloid activation and durable antitumor immunity. *Nat Cancer*. 2021 Jan;2(1):18-33.

219 Bukhalid RA, Duvall JR, Lancaster K, Catcott KC, Malli Cetinbas N, Monnell T, Routhier C, Thomas JD, Bentley KW, Collins SD, Ditty E, Eitas TK, Kelleher EW, Shaw P, Soomer-James J, Ter-Ovanesyan E, Xu L, Zurita J, Toader D, Damelin M, Lowinger TB. XMT-2056, a HER2-Directed STING Agonist Antibody-Drug Conjugate, Induces Innate Antitumor Immune Responses by Acting on Cancer Cells and Tumor-Resident Immune Cells. *Clin Cancer Res*. 2025 May 1;31(9):1766-1782.

220 Wu YT, Fang Y, Wei Q, Shi H, Tan H, Deng Y, Zeng Z, Qiu J, Chen C, Sun L, Chen ZJ. Tumor-targeted delivery of a STING agonist improves cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Dec 6;119(49):e2214278119.

221 Kenkel JA, Gadkari R, Henning KA, Kudirka R, Mallet WG, Ho PY, Sarma G, Chapin SJ, Bogaert L, Melrose JE, Zhou MN, Deol S, Kreder CL, Shen Y, Anand P, Lee A, Li H, Ackerman SE, Safina BS, Dornan D, Alonso MN, Kowanzetz M. PD-L1-targeted ISAC combines myeloid cell activation, immune-checkpoint inhibition and ADCP to improve anti-tumor efficacy over anti-PD-L1 antibodies in preclinical models. *J Immunother Cancer*. 2021 Nov;9(Suppl 2):A817.

222 Fu C. Where does ISAC (immune-stimulating antibody conjugates) go from here? *J Immunother Cancer*. 2025 Aug 25;13(8):e012500.

223 Tsuchikama K, Anami Y, Ha SYY, Yamazaki CM. Exploring the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Clin Oncol*. 2024 Mar;21(3):203-223.

224 Tang Z, Xie Y, Zeng Y. Antibody-drug conjugate: a newly developed biological missile for tumor treatment. *Front Oncol*. 2025 Oct 29;15:1688057.

225 Békés M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Mar;21(3):181-200.

226 Hughes SJ, Testa A, Thompson N, Churcher I. The rise and rise of protein degradation: Opportunities and challenges ahead. *Drug Discov Today*. 2021 Dec;26(12):2889-2897.

- 227 Levengood MR, Zhang X, Hunter JH, Emmerton KK, Miyamoto JB, Lewis TS, Senter PD. Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody-Drug Conjugates. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2017 Jan 16;56(3):733-737.
- 228 Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discov Today*. 2015 Jul;20(7):838-47.
- 229 Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *MAbs*. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212.
- 230 Li JY, Perry SR, Muniz-Medina V, Wang X, Wetzel LK, Rebelatto MC, Hinrichs MJ, Bezabeh BZ, Fleming RL, Dimasi N, Feng H, Toader D, Yuan AQ, Xu L, Lin J, Gao C, Wu H, Dixit R, Osbourn JK, Coats SR. A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy. *Cancer Cell*. 2016 Jan 11;29(1):117-29.
- 231 Pegram MD, Hamilton EP, Tan AR, Storniolo AM, Balic K, Rosenbaum AI, Liang M, He P, Marshall S, Scheuber A, Das M, Patel MR. First-in-Human, Phase 1 Dose-Escalation Study of Biparatopic Anti-HER2 Antibody-Drug Conjugate MEDI4276 in Patients with HER2-positive Advanced Breast or Gastric Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2021 Aug;20(8):1442-1453.
- 232 Jhaveri K, Han HS, Dotan E, Oh D, Ferrario C, Tolcher AW, Lee K, Liao C, Kang Y, Kim YH, Hamilton E, Spira A, Patel N, Karapetis CS, Rha SY, Boyken L, Woolery J, Bedard P. 460MO Preliminary results from a phase I study using the bispecific, human epidermal growth factor 2 (HER2)-targeting antibody-drug conjugate (ADC) zanidatamab zovodotin (ZW49) in solid cancers. *Ann Oncol*. 2022;33:S749-S750.
- 233 Aggarwal C, Azzoli CG, Spira AI, Solomon BJ, Le X, Rolfo C, Planchard D, Felip E, Wu YL, Ahn MJ, et al. EGRET: a first-in-human study of the novel antibody-drug conjugate (ADC) AZD9592 as monotherapy or combined with other anticancer agents in patients (pts) with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2023;41(16 Suppl):TPS3156.
- 234 Neijssen J, Cardoso RMF, Chevalier KM, Wiegman L, Valerius T, Anderson GM, Moores SL, Schuurman J, Parren PWHI, Strohl WR, Chiu ML. Discovery of amivantamab (JNJ-61186372), a bispecific antibody targeting EGFR and MET. *J Biol Chem*. 2021 Jan-Jun;296:100641.
- 235 Desnoyers LR, Vasiljeva O, Richardson JH, Yang A, Menendez EE, Liang TW, Wong C, Bessette PH, Kamath K, Moore SJ, Sagert JG, Hostetter DR, Han F, Gee J, Flandez J, Markham K, Nguyen M, Krimm M, Wong KR, Liu S, Daugherty PS, West JW, Lowman HB. Tumor-specific activation of an EGFR-targeting probody enhances therapeutic index. *Sci Transl Med*. 2013 Oct 16;5(207):207ra144.
- 236 Bleuez C, Koch WF, Urbach C, Hollfelder F, Jermutus L. Exploiting protease activation for therapy. *Drug Discov Today*. 2022 Jun;27(6):1743-1754.

- 237 Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009 Feb;9(1):32-71.
- 238 LeBeau AM, Lee M, Murphy ST, Hann BC, Warren RS, Delos Santos R, Kurhanewicz J, Hanash SM, VanBrocklin HF, Craik CS. Imaging a functional tumorigenic biomarker in the transformed epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 2;110(1):93-8.
- 239 Liu C, Sun C, Huang H, Janda K, Edgington T. Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy. *Cancer Res*. 2003 Jun 1;63(11):2957-64.
- 240 Boni V, Fidler MJ, Arkenau HT, Spira A, Meric-Bernstam F, Uboha N, Sanborn RE, Sweis RF, LoRusso P, Nagasaka M, et al. Praluzatamab Ravtansine, a CD166-Targeting Antibody-Drug Conjugate, in Patients with Advanced Solid Tumors: An Open-Label Phase I/II Trial. *Clin Cancer Res*. 2022 May 13;28(10):2020-2029.
- 241 Trang VH, Zhang X, Yumul RC, Zeng W, Stone IJ, Wo SW, Dominguez MM, Cochran JH, Simmons JK, Ryan MC, Lyon RP, Senter PD, Levensgood MR. A coiled-coil masking domain for selective activation of therapeutic antibodies. *Nat Biotechnol*. 2019 Jul;37(7):761-765.
- 242 Chang HW, Frey G, Liu H, Xing C, Steinman L, Boyle WJ, Short JM. Generating tumor-selective conditionally active biologic anti-CTLA4 antibodies via protein-associated chemical switches. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Mar 2;118(9):e2020606118.
- 243 Yamazaki CM, Yamaguchi A, Anami Y, Xiong W, Otani Y, Lee J, Ueno NT, Zhang N, An Z, Tsuchikama K. Antibody-drug conjugates with dual payloads for combating breast tumor heterogeneity and drug resistance. *Nat Commun*. 2021 Jun 10;12(1):3528.
- 244 Lyon RP, Setter JR, Bovee TD, Doronina SO, Hunter JH, Anderson ME, Balasubramanian CL, Duniho SM, Leiske CI, Li F, Senter PD. Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol*. 2014 Oct;32(10):1059-62.
- 245 Lyon RP, Bovee TD, Doronina SO, Burke PJ, Hunter JH, Neff-LaFord HD, Jonas M, Anderson ME, Setter JR, Senter PD. Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. *Nat Biotechnol*. 2015 Jul;33(7):733-5.
- 246 Yuan R, Moreira D, Smith J, Li X, Cheng C, Yu A, Hallam T, Bedard K. Next-generation immunostimulatory antibody-drug conjugate (iADC) combines direct tumor killing and innate immune stimulation to provide protective anti-tumor immunity. Poster Presentation: Th42; 2022.
- 247 Figueroa-Vazquez V, Ko J, Breunig C, Baumann A, Giesen N, Pálfi A, Müller C, Lutz C, Hechler T, Kulke M, Müller-Tidow C, Krämer A, Goldschmidt H, Pahl A, Raab MS. HDP-101, an Anti-BCMA Antibody-Drug Conjugate, Safely Delivers Amanitin to Induce Cell Death in Proliferating and Resting Multiple Myeloma Cells. *Mol Cancer Ther*. 2021 Feb;20(2):367-378.

248 Pomeroy AE, Schmidt EV, Sorger PK, Palmer AC. Drug independence and the curability of cancer by combination chemotherapy. *Trends Cancer*. 2022 Nov;8(11):915-929.

249 Tolaney SM, de Azambuja E, Kalinsky K, Loi S, Kim SB, Yam C, Rapoport B, Im SA, Pistilli B, Mchayleh W, Cescon DW, Watanabe J, Bañuelas MAL, Freitas-Junior R, Salvador Bofill J, Afshari M, Gary D, Wang L, Lai C, Schmid P; ASCENT-04/KEYNOTE-D19 Clinical Trial Investigators. Sacituzumab Govitecan plus Pembrolizumab for Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2026 Jan 22;394(4):354-366.

250 Gilbert L, Oaknin A, Matulonis UA, Mantia-Smaldone GM, Lim PC, Castro CM, Provencher D, Memarzadeh S, Method M, Wang J, Moore KN, O'Malley DM. Safety and efficacy of mirvetuximab soravtansine, a folate receptor alpha (FR α)-targeting antibody-drug conjugate (ADC), in combination with bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2023 Mar;170:241-247.

251 Wei Q, Li P, Yang T, Zhu J, Sun L, Zhang Z, Wang L, Tian X, Chen J, Hu C, Xue J, Ma L, Shimura T, Fang J, Ying J, Guo P, Cheng X. The promise and challenges of combination therapies with antibody-drug conjugates in solid tumors. *J Hematol Oncol*. 2024 Jan 4;17(1):1.

252 Fuentes-Antrás J, Genta S, Vijenthira A, Siu LL. Antibody-drug conjugates: in search of partners of choice. *Trends Cancer*. 2023 Apr;9(4):339-354.

253 Wahl AF, Donaldson KL, Mixan BJ, Trail PA, Siegall CB. Selective tumor sensitization to taxanes with the mAb-drug conjugate cBR96-doxorubicin. *Int J Cancer*. 2001 Aug 15;93(4):590-600.

254 Herrington-Symes A, Farys M, Khalili H, Brocchini S. Antibody fragments: prolonging circulation half-life (special issue: antibody research). *Adv Biosci Biotechnol*. 2013;4:689-698.

255 Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods*. 2001 Feb 1;248(1-2):47-66.

256 Kortt AA, Dolezal O, Power BE, Hudson PJ. Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting. *Biomol Eng*. 2001 Oct 15;18(3):95-108.

257 Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, Shively JE, Wu AM. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res*. 1996 Jul 1;56(13):3055-61.

258 Borsi L, Balza E, Bestagno M, Castellani P, Carnemolla B, Biro A, Leprini A, Sepulveda J, Burrone O, Neri D, Zardi L. Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int J Cancer*. 2002 Nov 1;102(1):75-85.

259 Perrino E, Steiner M, Krall N, Bernardes GJ, Pretto F, Casi G, Neri D. Curative properties of noninternalizing antibody-drug conjugates based on maytansinoids. *Cancer Res*. 2014 May 1;74(9):2569-78.

- 260 Medina Pérez VM, Baselga M, Schuhmacher AJ. Single-Domain Antibodies as Antibody-Drug Conjugates: From Promise to Practice-A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2024 Jul 27;16(15):2681.
- 261 Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. NANOBODIES®: A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 22;24(6):5994.
- 262 Rossotti MA, Bélanger K, Henry KA, Tanha J. Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. *FEBS J*. 2022 Jul;289(14):4304-4327.
- 263 Rouet R, Dudgeon K, Christie M, Langley D, Christ D. Fully Human VH Single Domains That Rival the Stability and Cleft Recognition of Camelid Antibodies. *J Biol Chem*. 2015 May 8;290(19):11905-17.
- 264 Shilova ON, Deyev SM. DARPins: Promising Scaffolds for Theranostics. *Acta Naturae*. 2019 Oct-Dec;11(4):42-53.
- 265 Frolova AY, Shramova EI, Kakuev DL, Martynov VI, Pakhomov AA, Deyev SM, Proshkina GM. Bispecific targeting system based on DARPins-modified light-chain ferritin for cancer chemotherapy. *Biochimie*. 2026 Jan;240:11-18.
- 266 Wang Y, Yan J, Li L, Chen T, Guo J, Lei L, Wu S, Zhu L, Chen X, Liu B. Mesothelin-directed protein-drug conjugates for mesothelin-low solid tumor therapy. *Nat Commun*. 2025 Aug 23;16(1):7889.
- 267 Yin W, Xu T, Ding H, Zhang J, Bodenko V, Tretyakova MS, Belousov MV, Liu Y, Oroujeni M, Orlova A, Tolmachev V, Gräslund T, Vorobyeva A. Comparison of HER2-targeted affibody conjugates loaded with auristatin- and maytansine-derived drugs. *J Control Release*. 2023 Mar;355:515-527.
- 268 Ullrich S, Nitsche C. Bicyclic peptides: Paving the road for therapeutics of the future. *Pept Sci*. 2024 Mar;116(2):e24326.
- 269 Bennett G, Brown A, Mudd G, Huxley P, Van Rietschoten K, Pavan S, Chen L, Watcham S, Lahdenranta J, Keen N. MMAE Delivery Using the Bicycle Toxin Conjugate BT5528. *Mol Cancer Ther*. 2020 Jul;19(7):1385-1394.
- 270 Deonarain MP, Xue Q. Tackling solid tumour therapy with small-format drug conjugates. *Antib Ther*. 2020 Nov 25;3(4):237-245.
- 271 Ma X, Wang M, Ying T, Wu Y. Reforming solid tumor treatment: the emerging potential of smaller format antibody-drug conjugate. *Antib Ther*. 2024 Feb 16;7(2):114-122.
- 272 Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res*. 1992 Jun 15;52(12):3402-8.
- 273 Debie P, Lafont C, Defrise M, Hansen I, van Willigen DM, van Leeuwen FWB, Gijsbers R, D'Huyvetter M, Devoogdt N, Lahoutte T, Mollard P, Hernot S. Size and affinity kinetics of nanobodies influence targeting and penetration of solid tumours. *J Control Release*. 2020 Jan 10;317:34-42.

274 Li Z, Krippendorff BF, Sharma S, Walz AC, Lavé T, Shah DK. Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments. *MAbs*. 2016;8(1):113-9.

275 Xenaki KT, Oliveira S, van Bergen En Henegouwen PMP. Antibody or Antibody Fragments: Implications for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Solid Tumors. *Front Immunol*. 2017 Oct 12;8:1287.

276 Dunlap T, Cao Y. Physiological Considerations for Modeling *in vivo* Antibody-Target Interactions. *Front Pharmacol*. 2022 Feb 24;13:856961.

277 Juweid M, Neumann R, Paik C, Perez-Bacete MJ, Sato J, van Osdol W, Weinstein JN. Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier. *Cancer Res*. 1992 Oct 1;52(19):5144-53.

278 Cilliers C, Menezes B, Nessler I, Linderman J, Thurber GM. Improved Tumor Penetration and Single-Cell Targeting of Antibody-Drug Conjugates Increases Anticancer Efficacy and Host Survival. *Cancer Res*. 2018 Feb 1;78(3):758-768.

279 Singh AP, Guo L, Verma A, Wong GG, Thurber GM, Shah DK. Antibody Coadministration as a Strategy to Overcome Binding-Site Barrier for ADCs: a Quantitative Investigation. *AAPS J*. 2020 Jan 14;22(2):28.

280 Perez EA, Barrios C, Eiermann W, Toi M, Im YH, Conte P, Martin M, Pienkowski T, Pivot XB, Burris HA 3rd, Petersen JA, De Haas S, Hoersch S, Patre M, Ellis PA. Trastuzumab emtansine with or without pertuzumab versus trastuzumab with taxane for human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: Final results from MARIANNE. *Cancer*. 2019 Nov 15;125(22):3974-3984.

281 Bordeau BM, Balthasar JP. Strategies to enhance monoclonal antibody uptake and distribution in solid tumors. *Cancer Biol Med*. 2021 Aug 15;18(3):649-64.

282 Heaps WP, Packard AE, McCammon KM, Green TP, Talley JP, Bundy BC, Della Corte D. Molecular survival strategies against kidney filtration: Implications for therapeutic protein engineering. *Biophysica*. 2026;6(4).

283 Knowles SM, Wu AM. Advances in immuno-positron emission tomography: antibodies for molecular imaging in oncology. *J Clin Oncol*. 2012 Nov 1;30(31):3884-92.

284 Olafsen T, Wu AM. Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med*. 2010 May;40(3):167-81.

285 Thurber GM, Zajic SC, Wittrup KD. Theoretic criteria for antibody penetration into solid tumors and micrometastases. *J Nucl Med*. 2007 Jun;48(6):995-9. doi: 10.2967/jnumed.106.037069. Epub 2007 May 15.

286 Schneider DW, Heitner T, Aliche B, Light DR, McLean K, Satozawa N, Parry G, Yoo J, Lewis JS, Parry R. *In vivo* biodistribution, PET imaging, and tumor accumulation of ⁸⁶Y- and ¹¹¹In-

antimindin/RG-1, engineered antibody fragments in LNCaP tumor-bearing nude mice. *J Nucl Med.* 2009 Mar;50(3):435-43.

287 Khawli LA, Biela B, Hu P, Epstein AL. Comparison of recombinant derivatives of chimeric TNT-3 antibody for the radioimaging of solid tumors. *Hybrid Hybridomics.* 2003 Feb;22(1):1-9.

288 Sundaresan G, Yazaki PJ, Shively JE, Finn RD, Larson SM, Raubitschek AA, Williams LE, Chatziioannou AF, Gambhir SS, Wu AM. ¹²⁴I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med.* 2003 Dec;44(12):1962-9.

289 Yin O, Iwata H, Lin CC, Tamura K, Watanabe J, Wada R, Kastrissios H, AbuTarif M, Garimella T, Lee C, Zhang L, Shahidi J, LaCreta F. Exposure-Response Relationships in Patients With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer and Other Solid Tumors Treated With Trastuzumab Deruxtecan. *Clin Pharmacol Ther.* 2021 Oct;110(4):986-996.

290 Kim KM, McDonagh CF, Westendorf L, Brown LL, Sussman D, Feist T, Lyon R, Alley SC, Okeley NM, Zhang X, Thompson MC, Stone I, Gerber HP, Carter PJ. Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 2008 Aug;7(8):2486-97.

291 Douez E, Allard-Vannier E, Amar IAM, Jolivet L, Boursin F, Maisonia-Besset A, Witkowski T, Chezal JM, Colas C, Letast S, Auvert E, Denevault-Sabourin C, Aubrey N, Joubert N. Branched pegylated linker-auristatin to control hydrophobicity for the production of homogeneous minibody-drug conjugate against HER2-positive breast cancer. *J Control Release.* 2024 Feb;366:567-584.

292 Bates A, Power CA. David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments. *Antibodies (Basel).* 2019 Apr 9;8(2):28.

293 Goel N, Stephens S. Certolizumab pegol. *mAbs.* 2010;2(2):137-147.

294 Nguyen QD, Das A, Do DV, Dugel PU, Gomes A, Holz FG, Koh A, Pan CK, Sepah YJ, Patel N, MacLeod H, Maurer P. Brolocizumab: Evolution through Preclinical and Clinical Studies and the Implications for the Management of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2020 Jul;127(7):963-976.

295 Lyu X, Zhao Q, Hui J, Wang T, Lin M, Wang K, Zhang J, Shentu J, Dalby PA, Zhang H, Liu B. The global landscape of approved antibody therapies. *Antib Ther.* 2022 Sep 6;5(4):233-257.

296 <https://grls.pharm-portal.ru/grls/b9c7c52b-04e1-4d23-befd-6dccbd0ad899>

297 Stein A, Franklin JL, Chia VM, Arrindell D, Kormany W, Wright J, Parson M, Amouzadeh HR, Choudhry J, Joseph G. Benefit-Risk Assessment of Blinatumomab in the Treatment of Relapsed/Refractory B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Drug Saf.* 2019 May;42(5):587-601.

298 Phase 3 efficiency clinical trial of tarlatamab in SCLC: Mountzios G, Sun L, Cho BC, Demirci U, Baka S, Gümüŝ M, Lugini A, Zhu B, Yu Y, Korantzis I, et al. Tarlatamab in Small-Cell Lung Cancer after Platinum-Based Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2025 Jul 24;393(4):349-361.

299 Portell CA, Wenzell CM, Advani AS. Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol.* 2013 Apr 12;5(Suppl 1):5-11.

300 Minocha M, Thompson CG, Murphy A, Zhou Y, Brandl C, Parkes A, Chen X, Yu B, Martinez P, Houk BE. Pharmacokinetics of Tarlatamab, a Delta-Like Ligand-3 (DLL3) Targeted Half-Life Extended Bispecific T-Cell Engager (BiTE®) Immunotherapy in Adult Patients with Previously Treated Small-Cell Lung Cancer: Results from DeLLphi-300, a Phase I Multiple-Dose-Escalation Study. *Clin Pharmacokinet.* 2024 Dec;63(12):1757-1768.

301 Mungalov RV, Mushenkova NV, Chudakov DM, Turchaninova MA. Engaging T cells for cleanup. *Front Immunol.* 2025 May 6;16:1551424.

302 Lowe KL, Cole D, Kenefeck R, OKelly I, Lepore M, Jakobsen BK. Novel TCR-based biologics: mobilising T cells to warm 'cold' tumours. *Cancer Treat Rev.* 2019 Jul;77:35-43.

303 Zhang F, Wei H, Wang X, Bai Y, Wang P, Wu J, Jiang X, Wang Y, Cai H, Xu T, Zhou A. Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discov.* 2017 Mar 7;3:17004.

304 Xu T, Wang L, Dong Y, Shan C. JSKN022, a first in class multi-specific ADC targeting PD-L1 and ITGB6/8 with an innovative DNA topoisomerase I inhibitor demonstrates encouraging efficacy in preclinical models. *Cancer Res.* 2025;85(8 Suppl 1):5450.

305 Cai X, Wu G, Ju D, Zhang C, Yu H. 1265P A promising MET-EGFR bispecific nanobody-drug conjugate therapy for multiple solid tumours. *Ann Oncol.* 2024;35(Suppl 2):S810.

306 Rossin R, Versteegen RM, Wu J, Khasanov A, Wessels HJ, Steenbergen EJ, Ten Hoeve W, Janssen HM, van Onzen AHAM, Hudson PJ, Robillard MS. Chemically triggered drug release from an antibody-drug conjugate leads to potent antitumour activity in mice. *Nat Commun.* 2018 May 4;9(1):1484.

307 Wu Y, Li Q, Kong Y, Wang Z, Lei C, Li J, Ding L, Wang C, Cheng Y, Wei Y, Song Y, Yang Z, Tu C, Ding Y, Ying T. A highly stable human single-domain antibody-drug conjugate exhibits superior penetration and treatment of solid tumors. *Mol Ther.* 2022 Aug 3;30(8):2785-2799.

308 Nessler I, Khera E, Vance S, Kopp A, Qiu Q, Keating TA, Abu-Yousif AO, Sandal T, Legg J, Thompson L, Goodwin N, Thurber GM. Increased Tumor Penetration of Single-Domain Antibody-Drug Conjugates Improves In Vivo Efficacy in Prostate Cancer Models. *Cancer Res.* 2020 Mar 15;80(6):1268-1278.

- 309 Fernández-Rilo AC, de Billy E, Del Baldo G, De Angelis B, Rossi S, Del Bufalo F, Quintarelli C, Locatelli F, Mastronuzzi A, Vinci M. GD2: hopes and challenges for the treatment of pediatric patients with tumors of the central nervous system. *NPJ Precis Oncol.* 2025 Aug 21;9(1):295.
- 310 Heimburg-Molinario J, Rittenhouse-Olson K. Development and characterization of antibodies to carbohydrate antigens. *Methods Mol Biol.* 2009;534:341-57.
- 311 Sorkin LS, Otto M, Baldwin WM 3rd, Vail E, Gillies SD, Handgretinger R, Barfield RC, Yu HM, Yu AL. Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain.* 2010 Apr;149(1):135-142.
- 312 Horwacik I, Rokita H. Application of molecular mimicry to target GD2 ganglioside. In: Shimada H, editor. *Neuroblastoma - Present and Future.* London: IntechOpen; 2012.
- 313 Mujoo K, Cheresch DA, Yang HM, Reisfeld RA. Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytolysis and suppression of tumor growth. *Cancer Res.* 1987 Feb 15;47(4):1098-104.
- 314 Mujoo K, Kipps TJ, Yang HM, Cheresch DA, Wargalla U, Sander DJ, Reisfeld RA. Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. *Cancer Res.* 1989 Jun 1;49(11):2857-61.
- 315 Gillies SD, Lo KM, Wesolowski J. High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. *J Immunol Methods.* 1989 Dec 20;125(1-2):191-202.
- 316 Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM; Children's Oncology Group. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010 Sep 30;363(14):1324-34.
- 317 Perez Horta Z, Goldberg JL, Sondel PM. Anti-GD2 mAbs and next-generation mAb-based agents for cancer therapy. *Immunotherapy.* 2016 Sep;8(9):1097-117.
- 318 Ladenstein R, Pötschger U, Valteau-Couanet D, Luksch R, Castel V, Yaniv I, Laureys G, Brock P, Michon JM, Owens C, Trahair T, Chan GCF, Ruud E, Schroeder H, Beck Popovic M, Schreier G, Loibner H, Ambros P, Holmes K, Castellani MR, Gaze MN, Garaventa A, Pearson ADJ, Lode HN. Interleukin 2 with anti-GD2 antibody ch14.18/CHO (dinutuximab beta) in patients with high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 Dec;19(12):1617-1629.
- 319 Zeng Y, Fest S, Kunert R, Katinger H, Pistoia V, Michon J, Lewis G, Ladenstein R, Lode HN. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Mol Immunol.* 2005 Jul;42(11):1311-9.

320 Anghelescu DL, Goldberg JL, Faughnan LG, Wu J, Mao S, Furman WL, Santana VM, Navid F. Comparison of pain outcomes between two anti-GD2 antibodies in patients with neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Feb;62(2):224-228.

321 Saito M, Yu RK, Cheung NK. Ganglioside GD2 specificity of monoclonal antibodies to human neuroblastoma cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Feb 28;127(1):1-7.

322 Cheung NK, Saarinen UM, Neely JE, Landmeier B, Donovan D, Coccia PF. Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 1985 Jun;45(6):2642-9.

323 Cheung NK, Lazarus H, Miraldi FD, Abramowsky CR, Kallick S, Saarinen UM, Spitzer T, Strandjord SE, Coccia PF, Berger NA. Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 1987 Sep;5(9):1430-40.

324 Kushner BH, Cheung IY, Modak S, Basu EM, Roberts SS, Cheung NK. Humanized 3F8 Anti-GD2 Monoclonal Antibody Dosing With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients With Resistant Neuroblastoma: A Phase 1 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018 Dec 1;4(12):1729-1735.

325 Doronin II, Vishnyakova PA, Kholodenko IV, Ponomarev ED, Ryazantsev DY, Molotkovskaya IM, Kholodenko RV. Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer*. 2014 Apr 28;14:295.

326 Kowalczyk A, Gil M, Horwacik I, Odrowaz Z, Kozbor D, Rokita H. The GD2-specific 14G2a monoclonal antibody induces apoptosis and enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Cancer Lett*. 2009 Aug 28;281(2):171-82.

327 Tsao CY, Sabbatino F, Cheung NK, Hsu JC, Villani V, Wang X, Ferrone S. Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of GD2 ganglioside-specific monoclonal antibody 3F8 in human melanoma cells. *Oncoimmunology*. 2015 Apr 2;4(8):e1023975.

328 Холоденко И.В., Доронин И.И., Вишнякова П.А., Болховитина Е.Л., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. Противоопухолевая активность GD2-специфичных антител и их Fab-фрагментов в мышинной модели рака. *Иммунология*, 2013, 34(4):198-202.

329 Cochonneau D, Terme M, Michaud A, Dorvillius M, Gautier N, Frikeche J, Alvarez-Rueda N, Bougras G, Aubry J, Paris F, Birklé S. Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 2013 Jun 10;333(2):194-204.

330 Larson SM, Carrasquillo JA, Cheung NK, Press OW. Radioimmunotherapy of human tumours. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jun;15(6):347-60.

331 Larrosa C, Mora J, Cheung NK. Global Impact of Monoclonal Antibodies (mAbs) in Children: A Focus on Anti-GD2. *Cancers (Basel)*. 2023 Jul 22;15(14):3729.

332 Santich BH, Cheal SM, Ahmed M, McDevitt MR, Ouerfelli O, Yang G, Veach DR, Fung EK, Patel M, Burnes Vargas D, Malik AA, Guo HF, Zanzonico PB, Monette S, Michel AO, Rudin CM, Larson SM, Cheung NK. A Self-Assembling and Disassembling (SADA) Bispecific Antibody (BsAb) Platform for Curative Two-step Pretargeted Radioimmunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2021 Jan 15;27(2):532-541.

333 Lode HN, Reisfeld RA, Handgretinger R, Nicolaou KC, Gaedicke G, Wrasidlo W. Targeted therapy with a novel enediyene antibiotic calicheamicin theta(I)1 effectively suppresses growth and dissemination of liver metastases in a syngeneic model of murine neuroblastoma. *Cancer Res.* 1998 Jul 15;58(14):2925-8.

334 Italiano, A.; Yonemori, K.; Haddock, C.L.; Ahnert, J.R.; Penel, N.; Schöffski, P.; Habermehl, C.; Sanz, V.P.; Demetri, G. A first-in-human phase 1, multicenter, open-label study of M3554, a novel anti-GD2 antibody–drug conjugate (ADC), in patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* 2025, 85, CT113.

335 Amendt C, Knuehl C, Crandall T, Sloot W, Toister-Achituv M, Sweeney-Lasch S, Pereira JNS, Dotterweich J, Boehm HH, Ma J, Anderl J. M3554, a novel anti-GD2 antibody drug conjugate. *Cancer Res.* 2024;84(7 Suppl):Abstract nr ND08.

336 Neri D, Sondel PM. Immunocytokines for cancer treatment: past, present and future. *Curr Opin Immunol.* 2016 Jun;40:96-102.

337 Shusterman S, London WB, Gillies SD, Hank JA, Voss SD, Seeger RC, Reynolds CP, Kimball J, Albertini MR, Wagner B, Gan J, Eickhoff J, DeSantes KB, Cohn SL, Hecht T, Gadbar B, Reisfeld RA, Maris JM, Sondel PM. Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol.* 2010 Nov 20;28(33):4969-75.

338 Morris ZS, Guy E, Francis D, Gressett M, Yang R, Rakhmievich A, Hank J, Gillies S, Harari P, Sondel P. In vivo synergy of radiation and hu14.18-IL2 immunocytokine results in a memory T cell response in a syngeneic murine melanoma model. *J Immunother Cancer.* 2014 Nov 6;2(Suppl 3):P160.

339 Morris ZS, Guy EI, Francis DM, Gressett MM, Werner LR, Carmichael LL, Yang RK, Armstrong EA, Huang S, Navid F, Gillies SD, Korman A, Hank JA, Rakhmievich AL, Harari PM, Sondel PM. In Situ Tumor Vaccination by Combining Local Radiation and Tumor-Specific Antibody or Immunocytokine Treatments. *Cancer Res.* 2016 Jul 1;76(13):3929-41.

340 Nguyen R, Moustaki A, Norrie JL, Brown S, Akers WJ, Shirinifard A, Dyer MA. Interleukin-15 Enhances Anti-GD2 Antibody-Mediated Cytotoxicity in an Orthotopic PDX Model of Neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2019 Dec 15;25(24):7554-7564.

341 Nguyen R, Zhang X, Sun M, Abbas S, Seibert C, Kelly MC, Shern JF, Thiele CJ. Anti-GD2 Antibodies Conjugated to IL15 and IL21 Mediate Potent Antitumor Cytotoxicity against Neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2022 Sep 1;28(17):3785-3796.

342 Xu H, Cheng M, Guo H, Chen Y, Huse M, Cheung NK. Retargeting T cells to GD2 pentasaccharide on human tumors using Bispecific humanized antibody. *Cancer Immunol Res.* 2015 Mar;3(3):266-77.

343 Hoseini SS, Dobrenkov K, Pankov D, Xu XL, Cheung NK. Bispecific antibody does not induce T-cell death mediated by chimeric antigen receptor against disialoganglioside GD2. *Oncoimmunology.* 2017 Apr 28;6(6):e1320625.

344 Cheng M, Santich BH, Xu H, Ahmed M, Huse M, Cheung NK. Successful engineering of a highly potent single-chain variable-fragment (scFv) bispecific antibody to target disialoganglioside (GD2) positive tumors. *Oncoimmunology.* 2016 May 5;5(6):e1168557.

345 Yankelevich M, Thakur A, Modak S, Chu R, Taub J, Martin A, Schalk D, Schienschang A, Whitaker S, Rea K, Lee DW, Liu Q, Shields AF, Cheung NV, Lum LG. Targeting refractory/recurrent neuroblastoma and osteosarcoma with anti-CD3×anti-GD2 bispecific antibody armed T cells. *J Immunother Cancer.* 2024 Mar 21;12(3):e008744.

346 Park JA, Santich BH, Xu H, Lum LG, Cheung NV. Potent ex vivo armed T cells using recombinant bispecific antibodies for adoptive immunotherapy with reduced cytokine release. *J Immunother Cancer.* 2021 May;9(5):e002222.

347 Zirngibl F, Ivasko SM, Grunewald L, Klaus A, Schwiebert S, Ruf P, Lindhofer H, Astrahantseff K, Andersch L, Schulte JH, Lode HN, Eggert A, Anders K, Hundsdoerfer P, Künkele A. GD2-directed bispecific trifunctional antibody outperforms dinutuximab beta in a murine model for aggressive metastasized neuroblastoma. *J Immunother Cancer.* 2021 Jul;9(7):e002923.

348 Ivasko SM, Anders K, Grunewald L, Launspach M, Klaus A, Schwiebert S, Ruf P, Lindhofer H, Lode HN, Andersch L, Schulte JH, Eggert A, Hundsdoerfer P, Künkele A, Zirngibl F. Combination of GD2-directed bispecific trifunctional antibody therapy with Pd-1 immune checkpoint blockade induces anti-neuroblastoma immunity in a syngeneic mouse model. *Front Immunol.* 2023 Jan 9;13:1023206.

349 Rosenkrans ZT, Erbe AK, Clemons NB, Feils AS, Medina-Guevara Y, Jeffery JJ, Barnhart TE, Engle JW, Sondel PM, Hernandez R. ImmunoPET Demonstrates that Co-Targeting GD2 and B7-H3 with Bispecific Antibodies Enhances Tumor Selectivity in Preclinical Melanoma Models. *Bioconjug Chem.* 2025 Aug 20;36(8):1595-1603.

350 Peng L, Sferruzza G, Yang L, Zhou L, Chen S. CAR-T and CAR-NK as cellular cancer immunotherapy for solid tumors. *Cell Mol Immunol.* 2024 Oct;21(10):1089-1108.

351 Yong CSM, Dardalhon V, Devaud C, Taylor N, Darcy PK, Kershaw MH. CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol Cell Biol.* 2017 Apr;95(4):356-363.

352 Anderson J, Barone G, Zehner A. GD2 targeting CAR T cells for neuroblastoma. *EJC Paediatr Oncol.* 2024;4:100179.

353 Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, Huls MH, Liu E, Gee AP, Mei Z, Yvon E, Weiss HL, Liu H, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med.* 2008 Nov;14(11):1264-70.

354 Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E, Liu H, Wu MF, Gee AP, Mei Z, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood.* 2011 Dec 1;118(23):6050-6.

355 Heczey A, Louis CU, Savoldo B, Dakhova O, Durett A, Grilley B, Liu H, Wu MF, Mei Z, Gee A, Mehta B, Zhang H, Mahmood N, Tashiro H, Heslop HE, Dotti G, Rooney CM, Brenner MK. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma. *Mol Ther.* 2017 Sep 6;25(9):2214-2224.

356 Shum T, Omer B, Tashiro H, Kruse RL, Wagner DL, Parikh K, Yi Z, Sauer T, Liu D, Parihar R, Castillo P, Liu H, Brenner MK, Metelitsa LS, Gottschalk S, Rooney CM. Constitutive Signaling from an Engineered IL7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor-Redirected T Cells. *Cancer Discov.* 2017 Nov;7(11):1238-1247.

357 Del Bufalo F, De Angelis B, Caruana I, Del Baldo G, De Ioris MA, Serra A, Mastronuzzi A, Cefalo MG, Pagliara D, Amicucci M, et al. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2023 Apr 6;388(14):1284-1295.

358 Locatelli F, Pagliara D, De Ioris MA, Becilli M, Del Baldo G, Serra A, Mastronuzzi A, Cefalo MG, Li Pira G, Leone G, et al. GD2-targeting CAR T cells in high-risk neuroblastoma: a phase 1/2 trial. *Nat Med.* 2025 Nov;31(11):3689-3699.

359 Quintarelli C, Del Bufalo F, De Ioris MA, Guercio M, Algeri M, Pagliara D, Silvestris DA, Di Nardo M, Sinibaldi M, Di Cecca S, et al. Donor-derived GD2-specific CAR T cells in relapsed or refractory neuroblastoma. *Nat Med.* 2025 Mar;31(3):849-860.

360 Mount CW, Majzner RG, Sundaresh S, Arnold EP, Kadapakkam M, Haile S, Labanieh L, Hulleman E, Woo PJ, Rietberg SP, Vogel H, Monje M, Mackall CL. Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T cells in H3-K27M+ diffuse midline gliomas. *Nat Med.* 2018 May;24(5):572-579.

361 Monje M, Mahdi J, Majzner R, Yeom KW, Schultz LM, Richards RM, Barsan V, Song KW, Kamens J, Baggott C, et al. Intravenous and intracranial GD2-CAR T cells for H3K27M+ diffuse midline gliomas. *Nature.* 2025 Jan;637(8046):708-715.

362 Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, Smith JP, Walker AJ, Kohler ME, Venkateshwara VR, Kaplan RN, Patterson GH, Fry TJ, Orentas RJ, Mackall CL. 4-1BB

costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med.* 2015 Jun;21(6):581-90.

363 Quintarelli C, Orlando D, Boffa I, Guercio M, Polito VA, Petretto A, Lavarello C, Sinibaldi M, Weber G, Del Bufalo F, Giorda E, Scarsella M, Petrini S, Pagliara D, Locatelli F, De Angelis B, Caruana I. Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma. *Oncoimmunology.* 2018 Mar 15;7(6):e1433518.

364 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.

365 Wakankar A, Chen Y, Gokarn Y, Jacobson FS. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs.* 2011 Mar-Apr;3(2):161-72.

366 Schneider S. Analysis of antibody drug conjugates using hydrophobic interaction chromatography with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. Application note, Agilent technologies. 2020.

367 Ouyang J. Drug-to-antibody ratio (DAR) and drug load distribution by hydrophobic interaction chromatography and reversed phase high-performance liquid chromatography. *Methods Mol Biol.* 2013;1045:275-83.

368 Lyon RP, Meyer DL, Setter JR, Senter PD. Conjugation of anticancer drugs through endogenous monoclonal antibody cysteine residues. *Methods Enzymol.* 2012;502:123-38.

369 Chen Y. Drug-to-antibody ratio (DAR) by UV/Vis spectroscopy. *Methods Mol. Biol.* 2013, 1045, 267–273.

370 Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986 May 22;89(2):271-7.

371 Harkness JE, Wagner JE. *The biology and medicine of rabbits and rodents*, 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989.

372 Kersemans V, Cornelissen B, Allen PD, Beech JS, Smart SC. Subcutaneous tumor volume measurement in the awake, manually restrained mouse using MRI. *J Magn Reson Imaging.* 2013 Jun;37(6):1499-504.

373 Senter PD, Sievers EL. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotechnol.* 2012 Jul 10;30(7):631-7.

374 Kozak KR, Tsai SP, Fourie-O'Donohue A, dela Cruz Chuh J, Roth L, Cook R, Chan E, Chan P, Darwish M, Ohri R, Raab H, Zhang C, Lin K, Wong WL. Total antibody quantification for MMAE-

conjugated antibody-drug conjugates: impact of assay format and reagents. *Bioconjug Chem.* 2013 May 15;24(5):772-9.

375 Nadkarni DV, Jiang Q, Friese O, Bazhin N, Meng H, Guo J, Kutlik R, Borgmeyer J. Process Development and Structural Characterization of an Anti-Notch 3 Antibody–Drug Conjugate. *Org. Process Res. Dev.* 2018, 22, 3, 286–295.

376 Debaene F, Boeuf A, Wagner-Rousset E, Colas O, Ayoub D, Corvaia N, Van Dorsselaer A, Beck A, Cianfèrani S. Innovative native MS methodologies for antibody drug conjugate characterization: High resolution native MS and IM-MS for average DAR and DAR distribution assessment. *Anal Chem.* 2014 Nov 4;86(21):10674-83.

377 Olafsen T, Kenanova VE, Wu AM. Generation of single-chain Fv fragments and multivalent derivatives scFv-Fc and scFv-CH3 (minibodies). In *Antibody Engineering*; Kontermann R, Dubel S. Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; Volume 2, pp. 69–84.

378 Goncalves J, Caliceti P. Optimizing Pharmacological and Immunological Properties of Therapeutic Proteins Through PEGylation: Investigating Key Parameters and Their Impact. *Drug Des Devel Ther.* 2024 Nov 7;18:5041-5062.

379 Gulyak EL, Komarova OA, Prokopenko YA, Faizullina EA, Malabuiok DM, Ibragimova AR, Mokrushina YA, Serova OV, Popova GP, Zhitlov MY, Nikitin TD, Brylev VA, Ustinov AV, Alferova VA, Korshun VA, Smirnov IV, Terekhov SS, Sapozhnikova KA. Branched Linkers for Homogeneous Antibody-Drug Conjugates: How Long Is Long Enough? *Int J Mol Sci.* 2024 Dec 12;25(24):13356.

380 Zhao RY, Wilhelm SD, Audette C, Jones G, Leece BA, Lazar AC, Goldmacher VS, Singh R, Kovtun Y, Widdison WC, Lambert JM, Chari RV. Synthesis and evaluation of hydrophilic linkers for antibody-maytansinoid conjugates. *J Med Chem.* 2011 May 26;54(10):3606-23.

381 Tedeschini T, Campara B, Grigoletto A, Bellini M, Salvalaio M, Matsuno Y, Suzuki A, Yoshioka H, Pasut G. Polyethylene glycol-based linkers as hydrophilicity reservoir for antibody-drug conjugates. *J Control Release.* 2021 Sep 10;337:431-447.

382 Tedeschini T, Campara B, Grigoletto A, Zanotto I, Cannella L, Gabbia D, Matsuno Y, Suzuki A, Yoshioka H, Armirotti A, De Martin S, Pasut G. Optimization of a pendant-shaped PEGylated linker for antibody-drug conjugates. *J Control Release.* 2024 Nov;375:74-89.

383 Ruderfer I, Shulman A, Kizhner T, Azulay Y, Nataf Y, Tekoah Y, Shaaltiel Y. Development and Analytical Characterization of Pegunigalsidase Alfa, a Chemically Cross-Linked Plant Recombinant Human α -Galactosidase-A for Treatment of Fabry Disease. *Bioconjug Chem.* 2018 May 16;29(5):1630-1639.

384 Li Q, Barrett A, Vijaykrishnan B, Tiberghien A, Beard R, Rickert KW, Allen KL, Christie RJ, Marelli M, Harper J, Howard P, Wu H, Dall'Acqua WF, Tsui P, Gao C, Borrok MJ. Improved Inhibition

of Tumor Growth by Diabody-Drug Conjugates via Half-Life Extension. *Bioconjug Chem.* 2019 Apr 17;30(4):1232-1243.

385 Li Q, Li W, Xu K, Xing Y, Shi H, Jing Z, Li S, Hong Z. PEG Linker Improves Antitumor Efficacy and Safety of Affibody-Based Drug Conjugates. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 3;22(4):1540.

386 Hartimath SV, El-Sayed A, Makhlof A, Bernhard W, Gonzalez C, Hill W, Parada AC, Barreto K, Geyer CR, Fonge H. Therapeutic potential of nimotuzumab PEGylated-maytansine antibody drug conjugates against EGFR positive xenograft. *Oncotarget.* 2019 Feb 1;10(10):1031-1044.

387 Jevsevar S, Kunstelj M, Porekar VG. PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnol J.* 2010 Jan;5(1):113-28.

388 Zhang C, Liu Y, Feng C, Wang Q, Shi H, Zhao D, Yu R, Su Z. Loss of PEG chain in routine SDS-PAGE analysis of PEG-maleimide modified protein. *Electrophoresis.* 2015 Jan;36(2):371-4.

389 Haraguchi M, Yamashiro S, Yamamoto A, Furukawa K, Takamiya K, Lloyd KO, Shiku H, Furukawa K. Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 25;91(22):10455-9.

390 Холоденко Р.В. Апоптозиндуцирующая активность моноклональных антител 14G2а к опухолевому ганглиозиду GD2 в Т-клеточной лимфоме EL-4. *Современные проблемы венерологии, иммунологии и врачебной косметологии.* 2010; 8(1): 17–23.

391 Sutherland MS, Sanderson RJ, Gordon KA, Andreyka J, Cerveny CG, Yu C, Lewis TS, Meyer DL, Zabinski RF, Doronina SO, Senter PD, Law CL, Wahl AF. Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates. *J Biol Chem.* 2006 Apr 14;281(15):10540-7.

392 Okeley NM, Miyamoto JB, Zhang X, Sanderson RJ, Benjamin DR, Sievers EL, Senter PD, Alley SC. Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. *Clin Cancer Res.* 2010 Feb 1;16(3):888-97.

393 Liu-Kreyche P, Shen H, Marino AM, Iyer RA, Humphreys WG, Lai Y. Lysosomal P-gp-MDR1 Confers Drug Resistance of Brentuximab Vedotin and Its Cytotoxic Payload Monomethyl Auristatin E in Tumor Cells. *Front Pharmacol.* 2019 Jul 17;10:749.

394 Yu SF, Zheng B, Go M, Lau J, Spencer S, Raab H, Soriano R, Jhunjhunwala S, Cohen R, Caruso M, Polakis P, Flygare J, Polson AG. A Novel Anti-CD22 Anthracycline-Based Antibody-Drug Conjugate (ADC) That Overcomes Resistance to Auristatin-Based ADCs. *Clin Cancer Res.* 2015 Jul 15;21(14):3298-306.

395 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.

- 396 Baldwin AD, Kiick KL. Tunable degradation of maleimide-thiol adducts in reducing environments. *Bioconjug Chem*. 2011 Oct 19;22(10):1946-53.
- 397 Szijj PA, Bahou C, Chudasama V. Minireview: Addressing the retro-Michael instability of maleimide bioconjugates. *Drug Discov Today Technol*. 2018 Dec;30:27-34.
- 398 Ulbricht J, Jordan R, Luxenhofer R. On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly(2-oxazoline)s. *Biomaterials*. 2014 Jun;35(17):4848-61.
- 399 Erickson HK, Lambert JM. ADME of antibody-maytansinoid conjugates. *AAPS J*. 2012 Dec;14(4):799-805.
- 400 Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, Sun MM, Lenox J, Cerveny CG, Kissler KM, Bernhardt SX, Kopcha AK, Zabinski RF, Meyer DL, Francisco JA. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):7063-70.
- 401 Sun X, Ponte JF, Yoder NC, Laleau R, Coccia J, Lanieri L, Qiu Q, Wu R, Hong E, Bogalhas M, Wang L, Dong L, Setiady Y, Maloney EK, Ab O, Zhang X, Pinkas J, Keating TA, Chari R, Erickson HK, Lambert JM. Effects of Drug-Antibody Ratio on Pharmacokinetics, Biodistribution, Efficacy, and Tolerability of Antibody-Maytansinoid Conjugates. *Bioconjug Chem*. 2017 May 17;28(5):1371-1381.
- 402 Chang HP, Kim SJ, Shah DK. Whole-Body Pharmacokinetics of Antibody in Mice Determined using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Derivation of Tissue Interstitial Concentrations. *J Pharm Sci*. 2021 Jan;110(1):446-457.
- 403 Shah DK, Betts AM. Antibody biodistribution coefficients: inferring tissue concentrations of monoclonal antibodies based on the plasma concentrations in several preclinical species and human. *MAbs*. 2013 Mar-Apr;5(2):297-305.
- 404 Khongorzul P, Ling CJ, Khan FU, Ihsan AU, Zhang J. Antibody-Drug Conjugates: A Comprehensive Review. *Mol Cancer Res*. 2020 Jan;18(1):3-19.
- 405 Senter PD. Potent antibody drug conjugates for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol*. 2009 Jun;13(3):235-44.
- 406 Junutula JR, Flagella KM, Graham RA, Parsons KL, Ha E, Raab H, Bhakta S, Nguyen T, Dugger DL, Li G, Mai E, Lewis Phillips GD, Hilaragi H, Fuji RN, Tibbitts J, Vandlen R, Spencer SD, Scheller RH, Polakis P, Sliwkowski MX. Engineered thio-trastuzumab-DM1 conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Oct 1;16(19):4769-78.
- 407 Strohl WR. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs*. 2015 Aug;29(4):215-39.
- 408 Milenic DE, Wong KJ, Baidoo KE, Nayak TK, Regino CA, Garmestani K, Brechbiel MW. Targeting HER2: a report on the in vitro and in vivo pre-clinical data supporting trastuzumab as a radioimmunoconjugate for clinical trials. *MAbs*. 2010 Sep-Oct;2(5):550-64.

409 Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA, Wu H, Kiener PA, Langermann S. Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. *J Immunol.* 2002 Nov 1;169(9):5171-80.

410 Olafsen T, Kenanova VE, Sundaresan G, Anderson AL, Crow D, Yazaki PJ, Li L, Press MF, Gambhir SS, Williams LE, Wong JY, Raubitschek AA, Shively JE, Wu AM. Optimizing radiolabeled engineered anti-p185HER2 antibody fragments for in vivo imaging. *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5907-16.

411 Kenanova V, Olafsen T, Crow DM, Sundaresan G, Subbarayan M, Carter NH, Ikle DN, Yazaki PJ, Chatziioannou AF, Gambhir SS, Williams LE, Shively JE, Colcher D, Raubitschek AA, Wu AM. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res.* 2005 Jan 15;65(2):622-31.

412 Dekkers G, Bentlage AEH, Stegmann TC, Howie HL, Lissenberg-Thunnissen S, Zimring J, Rispens T, Vidarsson G. Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. *MAbs.* 2017 Jul;9(5):767-773.

413 Li Y, Zhao L, Li XF. Hypoxia and the Tumor Microenvironment. *Technol Cancer Res Treat.* 2021 Jan-Dec;20:15330338211036304.

414 Wickramasinghe NS, Banerjee K, Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W. Hypoxia alters cathepsin B / inhibitor profiles in oral carcinoma cell lines. *Anticancer Res.* 2005 Jul-Aug;25(4):2841-9.

415 Evers M, Stip M, Keller K, Willemen H, Nederend M, Jansen M, Chan C, Budding K, Nierkens S, Valerius T, Meyer-Wentrup F, Eijkelkamp N, Leusen J. Anti-GD2 IgA kills tumors by neutrophils without antibody-associated pain in the preclinical treatment of high-risk neuroblastoma. *J Immunother Cancer.* 2021 Oct;9(10):e003163.

416 Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA. Long-lived and transferable tumor immunity in mice after targeted interleukin-2 therapy. *J Clin Invest.* 1996 Dec 15;98(12):2801-4.

417 Hoefges A, McIlwain SJ, Erbe AK, Mathers N, Xu A, Melby D, Tetreault K, Le T, Kim K, Pinapati RS, Garcia BH, Patel J, Heck M, Feils AS, Tsarovsky N, Hank JA, Morris ZS, Ong IM, Sondel PM. Antibody landscape of C57BL/6 mice cured of B78 melanoma via a combined radiation and immunocytokine immunotherapy regimen. *Front Immunol.* 2023 Nov 23;14:1221155.

418 Clark PA, Sriramaneni RN, Jin WJ, Jagodinsky JC, Bates AM, Jaquish AA, Anderson BR, Le T, Lubin JA, Chakravarty I, Arthur IS, Heinze CM, Guy EI, Kler J, Klar KA, Carlson PM, Kim KM, Kuo JS, Morris ZS. In situ vaccination at a peripheral tumor site augments response against melanoma brain metastases. *J Immunother Cancer.* 2020 Jul;8(2):e000809.

419 Vaisman-Mentesh A, Gutierrez-Gonzalez M, DeKosky BJ, Wine Y. The Molecular Mechanisms That Underlie the Immune Biology of Anti-drug Antibody Formation Following Treatment With Monoclonal Antibodies. *Front Immunol.* 2020 Aug 18;11:1951.

420 Carrasco-Triguero M, Dere RC, Milojic-Blair M, Saad OM, Nazzal D, Hong K, Kaur S. Immunogenicity of antibody-drug conjugates: observations across 8 molecules in 11 clinical trials. *Bioanalysis.* 2019 Sep;11(17):1555-1568.

421 Dere RC, Beardsley RL, Lu D, Lu T, Ku GH, Man G, Nguyen V, Kaur S. Integrated summary of immunogenicity of polatuzumab vedotin in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Front Immunol.* 2023 Mar 29;14:1119510.

422 Ruf P, Schäfer B, Eissler N, Mocikat R, Hess J, Plösch M, Wosch S, Suckstorff I, Zehetmeier C, Lindhofer H. Ganglioside GD2-specific trifunctional surrogate antibody Surek demonstrates therapeutic activity in a mouse melanoma model. *J Transl Med.* 2012 Nov 7;10:219.

423 Kennedy PT, Zannoupa D, Son MH, Dahal LN, Woolley JF. Neuroblastoma: an ongoing cold front for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2023 Nov 22;11(11):e007798.

424 Louault K, De Clerck YA, Janoueix-Lerosey I. The neuroblastoma tumor microenvironment: From an in-depth characterization towards novel therapies. *EJC Paediatr Oncol.* 2024 Jun;3:100161.

425 Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, Petroni G, Yamazaki T, Liu P, Zhao L, Spisek R, Kroemer G, Galluzzi L. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis.* 2020 Nov 26;11(11):1013.

Приложения.

Приложение 1. Аминокислотная структура антитела ch14.18.

Последовательности тяжелой и легкой цепей антитела dinutuximab [источник: международная система иммуногенетической информации, www.imgt.org].

Тяжелая цепь. Chain ID: INN 9754_H

EVQLLQSGPE LEKPGASVMI SCKASGSSFT GYNMNWVRQN IGKSLEWIGA 50
 IDPYYGGTSY NQKFKGRATL TVDKSSSTAY MHLKSLTSED SAVYYCVSGM 100
 EYWGQGTSVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 150
 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH 200
 KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS 250
 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS 300
 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAQGQPR EPQVYTLPPS 350
 REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF 400
 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKLSLSL PGK 443

Вариабельный домен V_H: 1-113. Константный домен C_{H1}: 114-211. Hinge-регион: 212-226.
 Константный домен C_{H2}: 227-336. Константный домен C_{H3}: 337-441.

Молекулярная масса тяжелой цепи 48436 Да; изоэлектрическая точка pI: 8.35 [расчет в ProtParam, www.expasy.org].

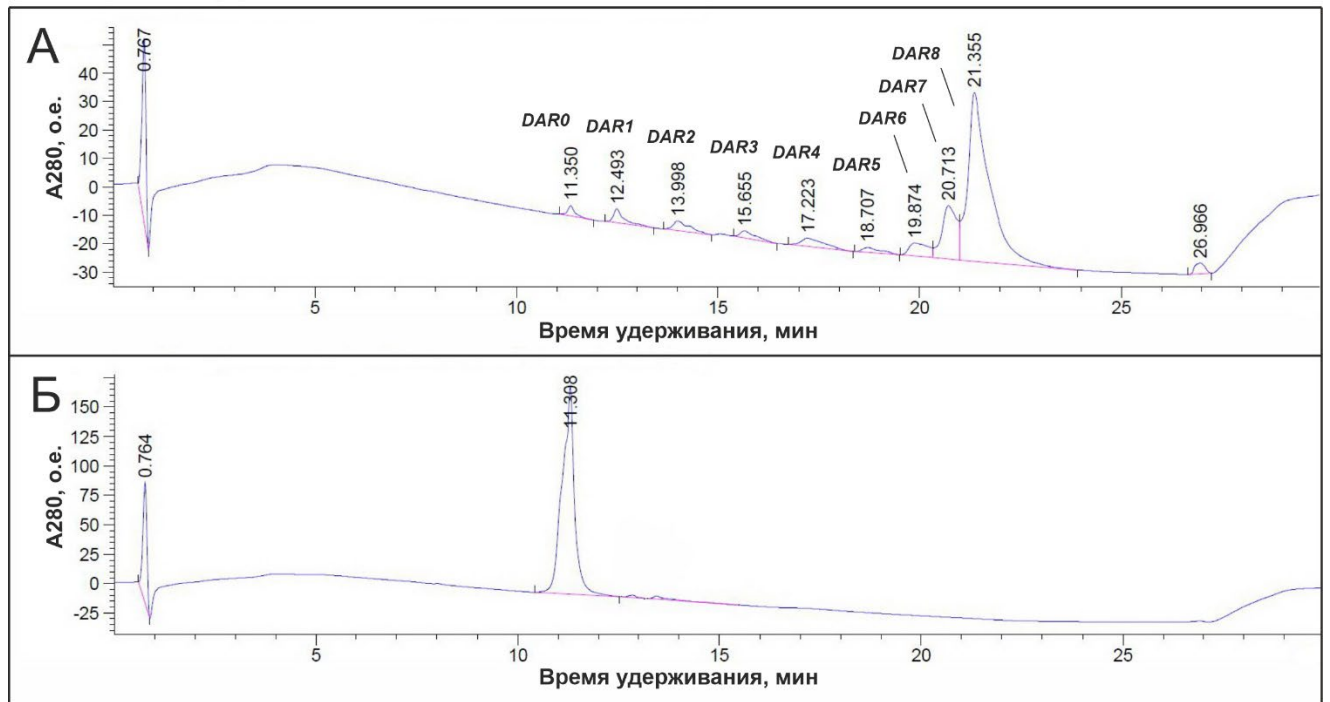
Легкая цепь. Chain ID: INN 9754_L

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRSSQSLV HRNGNTYLHW YLQKPGQSPK 50
 LLIHKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP 100
 PLTFGAGTKL ELKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA 150
 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLKA DYKHKVYAC 200
 EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC 220

Вариабельный домен V_L: 1-113. Константный домен C_L: 114-220.

Молекулярная масса легкой цепи: 24071 Да; изоэлектрическая точка pI: 8.58.

Приложение 2. Расчет степени пришивки DAR для ch14.18-ММАЕ в хроматографии гидрофобных взаимодействий.



Анализ степени пришивки лекарства к антителу в хроматографии гидрофобных взаимодействий. А. Хроматограмма конъюгата ch14.18-ММАЕ. Б. Хроматограмма антитела ch14.18. Хроматограммы представлены в режиме автоматического интегрирования пиков; над каждым пиком указано время удерживания на колонке, а значения площадей пиков приведены в таблице ниже.

Взвешенное среднее значение степени пришивки лекарства к антителу DAR рассчитано как $\sum(\text{DAR}_i \times \text{площадь пика в процентах от суммарной площади})/100 = 7.0$.

DAR _i	Время удерживания пика [мин]	Ширина [мин]	Высота [о.е.]	Площадь [о.е.*сек]	Площадь, %
0	11.35	0.18	3.61	45.92	1.37
1	12.493	0.24	5.02	90.14	2.69
2	13.998	0.40	2.29	94.61	2.82
3	15.655	0.37	2.55	67.72	2.02
4	17.223	0.53	2.90	118.11	3.52
5	18.707	0.48	1.71	57.16	1.70
6	19.874	0.48	4.54	157.19	4.69
7	20.713	0.37	18.71	484.97	14.46
8	21.355	0.50	59.41	2238.43	66.73

Приложение 3. Антиген-связывающие свойства флуоресцентно-меченных препаратов для экспериментов в мышинной модели рака.

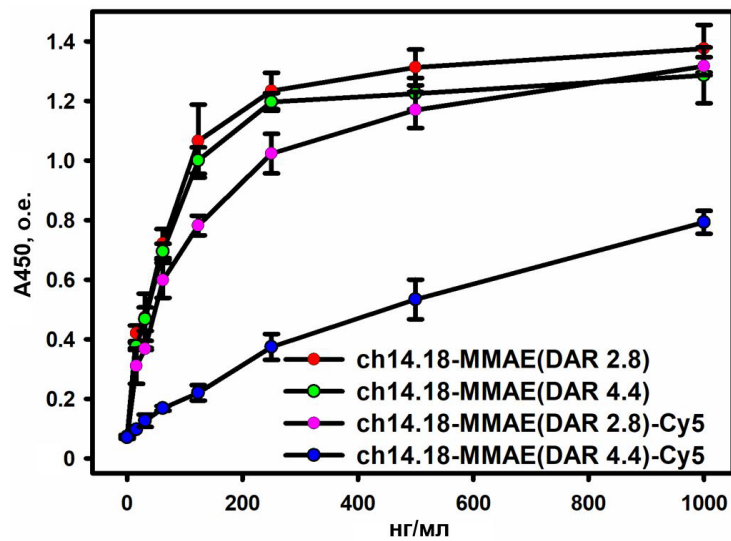


Рисунок 1. Прямой ИФА проведен для сравнения антиген-связывающих свойств конъюгатов ch14.18-MMAE с DAR 2.8 и DAR 4.4 и их флуоресцентно-меченных флуорофором Cy5 производных. Ганглиозид GD2 сорбирован на подложке.

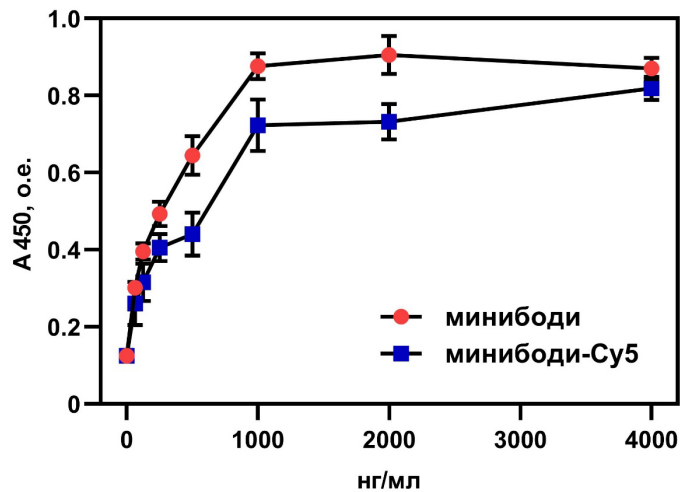


Рисунок 2. Прямой ИФА проведен для сравнения антиген-связывающих свойств минибоди и его флуоресцентно-меченого флуорофором Cy5 производного. Ганглиозид GD2 сорбирован на подложке.

Приложение 4. Биораспределение препаратов в мышинной модели рака.

Таблица 1. Биораспределение в ткани после внутривенного введения мышам ADC ch14.18-ММАЕ или антитела ch14.18 через 24 ч и 48 ч после инъекции. Данные представлены в виде процента от введенной дозы в пересчете на грамм типа ткани, значения выражены как среднее значение \pm S.E.M., рассчитанное для групп из трех животных.

Ткань	ch14.18 24 ч	ch14.18-ММАЕ 24 ч	ch14.18 48 ч	ch14.18-ММАЕ 48 ч
	% введенной дозы / грамм ткани \pm S.E.M.			
Кровь	20.0 \pm 2.4	19.7 \pm 3.5	9.8 \pm 1.6	13.4 \pm 2.5
Опухоль	3.2 \pm 0.7	3.6 \pm 0.8	6.4 \pm 1.1	7.7 \pm 0.8
Мышцы	0.3	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
Селезенка	1.3 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
Почки	1.3 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1
Печень	3.9 \pm 0.8	3.6 \pm 0.5	2.0 \pm 0.6	2.6 \pm 0.6
Легкие	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1
Сердце	0.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
Мозг	0	0.1	0.1	0

Таблица 2. Биораспределение в ткани после внутривенного введения мышам минибоди или антитела ch14.18 через 2, 4, 8 и 24 ч после инъекции. Данные представлены в виде процента от введенной дозы в пересчете на грамм типа ткани, значения выражены как среднее значение \pm S.E.M., рассчитанное для групп из трех животных.

Ткань	минибоди				ch14.18			
	2 ч	4 ч	8 ч	24 ч	2 ч	4 ч	8 ч	24 ч
	% введенной дозы / грамм ткани \pm S.E.M.							
Кровь	23.5 \pm 2.6	8.2 \pm 0.9	3.1 \pm 0.5	0.9 \pm 0.1	56.9 \pm 3.0	42.2 \pm 4.1	35.8 \pm 3.6	21.9 \pm 2.7
Опухоль	2.1 \pm 0.4	2.8 \pm 0.4	1.5 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	1.6 \pm 0.3	2.0 \pm 0.3	2.3 \pm 0.2	4.3 \pm 0.7
Мышцы	-	0.1	0.1 \pm 0.1	0.1	-	0.1	0.4 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
Селезенка	-	1.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	-	0.7 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1
Почки	-	7.7 \pm 0.6	5.4 \pm 0.5	1.5 \pm 0.4	-	1.7 \pm 0.3	2.6 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3
Печень	-	29.3 \pm 3.8	17.7 \pm 4.2	11.2 \pm 1.6	-	14.6 \pm 2.9	11.8 \pm 2.9	6.5 \pm 0.9
Легкие	-	0.8 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	-	3.9 \pm 0.8	3.8 \pm 0.5	1.3 \pm 0.4
Сердце	-	0.7 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	-	0.6	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2
Мозг	-	0.1	0.1	0.1	-	0.1	0.1 \pm 0.1	0.1