

УДК 615.076.7

**СРАВНЕНИЕ *IN VITRO* КОНЬЮГАТОВ АФФИБОДИ ДЛЯ HER-2 ТЕРАПИИ, СОДЕРЖАЩИХ
АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН И ПОЛИПЕПТИД PAS**

В.В. Боденко

Научный руководитель: профессор, д.фарм.н. М.В. Белоусов
Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050
E-mail: bodenkovitalina@gmail.com

***IN VITRO* COMPARISON OF HER-2 TARGETING AFFIBODY CONJUGATES FUSED WITH AN
ALBUMIN BINDING DOMAIN AND A PAS POLYPEPTIDE**

V.V. Bodenko

Scientific Supervisor: Prof., Dr. M.V. Belousov
Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050
E-mail: bodenkovitalina@gmail.com

Abstract. *In this study, we conducted an in vitro study comparing the potential of targeted therapeutic drugs containing a cytotoxic agent mc-DM1. The therapeutic potential of using an HER2-targeting Affibody molecule fused to an albumin-binding domain (ABD) to increase half-life and conjugated to the cytotoxic maytansine derivative, MC-DM1, has previously been confirmed. In this study, we also investigated the potential of a targeted therapeutic conjugate that includes an Affibody molecule targeting HER2 and the cytotoxic agent MC-DM1, and the PAS600 polypeptide was the hallmark of the drug design. PAS polypeptides represent a novel class of biosynthetic polymers comprising repetitive sequences of the small proteinogenic amino acids L-proline, L-alanine and/or L-serine. In this study, PAS600 used to increase the half-life of the drug. We conducted in vitro studies comparing the potential of the new (HE)₃ZHER2-Cys/DM1-PAS600 variant molecule with the previously studied (HE)₃ZHER2-ABD-Cys/DM1 molecule.*

Введение. Таргетные терапевтические лекарственные препараты, содержащие в своем составе молекулу аффибоди в качестве молекулы для таргетной доставки и цитотоксический агент, представляют собой новый класс сильнодействующих биофармацевтических препаратов, разработанных для преодоления резистентности к традиционной таргетной терапии и снижения нецелевой токсичности. Молекулы аффибоди (*Affibody, Inc.*) представляют собой каркасные белки малого размера (6–7 кДа) [1], которые можно сконструировать таким образом, чтобы они связывались с желаемыми мишенями с высокой аффинностью. В настоящее время молекулы аффибоди связываются с высокой аффинностью с несколькими молекулярными мишенями, связанными с раком, такими как рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор 3 эпидермального фактора роста человека (HER3), инсулиноподобный рост [2-4]. Однако важной проблемой для доставки полезной нагрузки с использованием небольших белков, таких как молекулы аффибоди, является быстрая экскреция почками [5]. Короткий период полувыведения *in vivo* может снизить активность и ухудшить соблюдение пациентом режима лечения из-за необходимости более частых

назначений. Одним из решений существующей проблемы является включение альбумин-связывающего домена (ABD) в конструкцию терапевтического препарата для продления периода полувыведения из плазмы крови за счет его связывания с сывороточным альбумином [1, 5].

Ранее был подтвержден терапевтический потенциал использования молекулы аффибоди (*Affibody, Inc.*), нацеленной на HER2, слитой с альбумин-связывающим доменом (ABD) и конъюгированной с цитотоксическим производным майтанзина MC-DM1 [1, 5, 3]. В данном исследовании мы также рассмотрели потенциал таргетного терапевтического конъюгата, в состав которого входит молекула аффибоди (*Affibody, Inc.*), нацеленной на HER2 и цитотоксический агент MC-DM1, но отличительным звеном в конструкции препарата являлся полипептид PAS600, используемый для увеличения периода полувыведения препарата из плазмы крови. PAS – новый класс биосинтетических полимеров. PAS600 представляет собой полипептид, содержащий повторяющиеся генетически кодируемые последовательности малых протеиногенных аминокислот L-пролина, L-аланина и/или L-серина. Данные аминокислотные последовательности образуют нативную неструктурированную полипептидную цепь с высокой растворимостью и отсутствием заряда. Кроме того, они биоразлагаемы, что позволяет избежать накопления в органах, при этом проявляя стабильность в сыворотке и отсутствие токсичности или иммуногенности у мышей [6-8]. Мы провели исследования *in vitro*, в ходе которых сравнили потенциал новой молекулы варианта (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600 с ранее исследованной молекулой (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1. Эффективная интернализация DM1-конъюгатов является важным свойством, поскольку создает предпосылки для внутриклеточного высвобождения лекарственного средства и блокирования полимеризации тубулина [3, 4].

Экспериментальная часть. Для проведения исследования *in vitro* оба терапевтических варианта с цитотоксическими агентами предварительно были мечены ^{99m}Tc. Для сайт-специфического радиоактивного мечения элюированный пертехнетат, ^{99m}TcO₄⁻ (400–500 мкл) из ⁹⁹Mo/^{99m}Tc генератора был добавлен в набор CRS (PSI, Villigen, Швейцария) для получения (^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃). Смесь осторожно встряхивали и инкубировали при 100 °C в течение 30 мин. После инкубации 50 мкл раствора трикарбонилтехнеция нейтрализовали 150 мкл соляной кислоты. Полученный раствор добавляли в пробирку, содержащую 60 мкг (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600 в 30 мкл PBS или 30 мкг (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1 в 28 мкл PBS, и инкубировали в течение 60 мин при 60 °C. Для очистки исследуемых вариантов с радиоактивной меткой смесь пропускали через колонку эксклюзионной гелевой фильтрации NAP-5 (GE Healthcare), предварительно уравновешенную PBS, и элюировали раствором PBS. Радиохимический выход и чистоту конъюгатов определяли с использованием полосок ITLC (150–771 DARK GREEN Tec-Control Chromatography strips (Biodex Medical Systems, Ширли, штат Нью-Йорк, США), элюированных PBS, и измеряли с использованием системы Cyclone Storage Phosphor System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Для теста интернализации HER-2 экспрессирующие клетки SKOV3 и BT474 высевали в чашки петри за сутки до эксперимента, по три чашки на каждую часовую точку. Среду удаляли с последующим добавлением ^{99m}Tc-меченых конъюгатов в культуральную среду (2 нМ). Клетки инкубировали при 37 °C. Далее в часовые точки (1, 2, 4, 6 и 24 ч) собирали среду, промывали охлажденным льдом PBS (1 мл). Добавляли к клеткам на льду 0,2 М глициновый буфер для сбора активности, связанной с клеточной мембраной. Далее к клеткам добавляли 1 М раствор NaOH (1 мл) на 30 мин при

37 °С. Клеточный слой, содержащий интернализированную активность, собирали скребком, чашки промывали тем же буфером (1 мл), который далее собирали. Активность собранной среды, связанную с мембраной активность и интернализированную активность измеряли с использованием автоматического гамма-спектрометра (1480 Wizard, Wallac, Finland).

Результаты. Оба варианта (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600 и (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1 были эффективно мечены ^{99m}Tc (радиохимический выход составлял 81–93 %). Радиохимическая чистота после очистки эксклюзионной хроматографией составила > 99 %. Проведенный тест интернализации *in vitro* показал, что для каждого исследуемого варианта ассоциированная с клеткой активность и интернализированная активность увеличивались со временем. Интернализированная активность через 24 часа для вариантов (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600 и (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1 составляла 29 % и 35 % от общей клеточно-ассоциированной активности в клетках SKOV3 и 16 % и 27 % в клетках BT474 соответственно.

Заключение. Исходя из результатов выполненного исследования, мы приходим к такому выводу, что радиокатаболиты как варианта (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600, так и (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1 не диффундируют через клеточные мембраны и остаются внутри клеток после HER2-опосредованного эндоцитоза и деградации белка в лизосомах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Altai M. Affibody-derived drug conjugates: Potent cytotoxic molecules for treatment of HER2 over-expressing tumors // *J. Control. Release.* – 2018. – № 288. – P. 84-95.
2. Tolmachev V. Radionuclide Therapy of HER2-Positive Microxenografts Using a ¹⁷⁷Lu-Labeled HER2-Specific Affibody Molecule // *Cancer Res.* – 2007. – № 67. – P. 2773-2782.
3. Xu T. Effect of Inter-Domain Linker Composition on Biodistribution of ABD-Fused Affibody-Drug Conjugates Targeting HER2 // *Pharmaceutics.* – 2022. – V. 3., № 14. – P. 522.
4. Liu Y. Biologic Evaluation of a Heterodimeric HER2-Albumin Targeted Affibody Molecule Produced by Chemo-Enzymatic Peptide Synthesis // *Pharmaceutics.* – 2022. – V. 11., №14. – P. 2519.
5. Ding H. Incorporation of a Hydrophilic Spacer Reduces Hepatic Uptake of HER2-Targeting Affibody-DM1 Drug Conjugates // *Cancers.* – 2019. – V. 11., № 8. – P. 1168.
6. Gebauer M. Prospects of PASylation® for the design of protein and peptide therapeutics with extended half-life and enhanced action // *Bioorg Med Chem.* – 2018. – V. 10., № 26. – P. 2882-2887.
7. Schiefner A. Proline/alanine-rich sequence (PAS) polypeptides as an alternative to PEG precipitants for protein crystallization // *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* – 2020. – № 76. – P. 320-325.
8. Schlapschy M. PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins // *Protein engineering, design & selection: PEDS.* – 2013. – V. 8., № 26. – P. 489-501.