

УДК 615.076.7

**Влияние расположения ABD на таргетные свойства нового бивалентного
терапевтического конъюгата на основе DARPIn G3**А.А. Прач¹, В.В. Боденко^{1,2}, А.С. Фоминых¹

Научный руководитель: доцент, к.х.н., Е.В. Плотников

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050²Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050E-mail: nastya.prach@mail.ru**The effect of ABD location on the target properties of a novel bivalent
therapeutic conjugate based on DARPIn G3**A.A. Prach¹, V.V. Bodenko^{1,2}, A.S. Fominykh¹

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., |Ph.D., E.V. Plotnikov

¹Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050²Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow Trakt str., 2, 634050E-mail: nastya.prach@mail.ru

Abstract. *In the present study, we conducted an in vitro and in vivo study of therapeutic conjugates based on the cytotoxic agent emtansine and hybrid proteins consisting of two DARPIn G3 molecules fused with albumin-binding domain.*

Key words: *targeted therapy, scaffold proteins, ovarian cancer, DARPIn G3, HER2, emtansin.*

Введение

HER2 – тирозинкиназный рецептор эпидермального фактора роста, который часто гиперэкспрессируется при различных видах рака, в частности при раке яичников. Одной из причин высокой смертности при раке яичников, несмотря на разнообразие методов лечения, является его позднее выявление и, таким образом, широкое распространение метастазов в брюшной полости. Примерно 70 % случаев рака яичников диагностируются на поздней стадии, а 5-летняя выживаемость таких пациенток составляет всего 17 % [1]. На сегодняшний день не существует оптимальной стратегии лечения рака яичников, однако в качестве стандарта первой линии лечения были установлены сочетание цитотоксических средств на основе платины и конъюгатов на основе моноклональных антител (mAb) с цитотоксическим агентом таких как бевацизумаб и карбоплатин/паклитаксел [2].

Каркасный белок DARPIn G3 обладает небольшими размерами (14–18 кДа), пикомолярной аффинностью к рецептору HER2 (91 пмоль/л) и высокой термостабильностью [3]. Чтобы преодолеть ограничение, связанное с быстрым клиренсом, было разработано несколько стратегий продления периода полураспада [4]. Одна из этих стратегий основана на слиянии с альбуминсвязывающим доменом (ABD), который за счет нековалентного взаимодействия с альбумином человека снижает захват в почках [5].

Таким образом целью данной работы является исследование терапевтических конъюгатов на основе цитотоксического агента эмтамзина и гибридных белков, состоящих из двух молекул DARPIn G3, к C- или к N-концу которых присоединен альбумин-связывающий домен.

Экспериментальная часть

Наработка и выделение белка. Рекомбинантные штаммы-продуценты получали с плазмид рЕТ39b-SUMO-HE3-G3-G3-ABD-E3C и рЕТ39b-SUMO-HE3-ABD-G3-G3-E3C путем трансформации штамма *E. coli*. Каркасные белки экспрессировались в слитом виде с альбуминсвязывающим доменом (ABD), белковые домены были соединены линкерами с

аминокислотной последовательностью (GSS)₃. N-конец белка снабжен последовательностью (HE)₃, а C-конец последовательностью EEEС.

Конъюгация с эмтанзином. На первой стадии для уменьшения количества потенциально окисленных цистеинов к раствору белков добавляли молярный избыток дитиотреитола с последующей инкубацией при 40 °С в течение 1 ч. Затем к восстановленным белкам добавляли 5-кратный молярный избыток эмтанзина (DM1) (DC Chemicals Limited, Китай) с последующей инкубацией при 40 °С в течение 1 ч, а затем в течение ночи при 4 °С. Непрореагировавший с белками DM1 очищали с помощью колонок NAP-5 (Cytiva, Великобритания). Процесс конъюгации с хлорацетамидом (CAA) близок к конъюгации с DM1. После первой стадии восстановления к белкам добавляли свежерастворенный молярный избыток хлорацетамида с последующей инкубацией в течение 30 минут при комнатной температуре в темном месте. Непрореагировавший с белками CAA очищали с помощью колонок NAP-5.

Исследования in vitro. Для исследований in vitro терапевтические конъюгаты метили ^{99m}Tc путем хелатирования карбонильного технеция-99m аминокислотной последовательностью (HE)₃, расположенной на N-конце белков. Интернализация терапевтических конъюгатов оценивалась с использованием метода кислотной промывки при инкубации клеток SKOV-3 с раствором меченных конъюгатов с временными точками от 1 ч до 24 часов [6]. Аффинность связывания GGA-DM1 и AGG-DM1, меченных технецием-99m, с клетками SKOV-3 оценивали по достижению насыщения рецепторов в концентрациях от 0,2 до 40 нМ. Специфичность связывания изучали на клеточных линиях: SKOV3, SKBR3, PC-3, A-431, BT-474. В контрольных чашках для насыщения клеточных рецепторов клетки предварительно инкубировали с избытком немеченого DARPin G3. Чтобы оценить влияние человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) на специфичность связывания, для ранее описанного эксперимента использовали среду, содержащую ЧСА. Эксперимент проводили в трех повторениях.

Исследования in vivo. Для оценки фармакокинетики, было проведено исследование биораспределения с использованием здоровых мышей, 48 самок мышей CD1 были разделены на группы по четыре мыши в каждую временную точку. Мышам внутривенно вводили [^{99m}Tc]Tc-G3-G3-ABD-DM1, [^{99m}Tc]Tc-ABD-G3-G3-DM1 или [^{99m}Tc]Tc-G3-ABD-DM1, [^{99m}Tc]Tc-ABD-G3-DM1 в фосфатно-солевого буфере с 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Для изучения внутривенного введения в сравнении с внутрибрюшинным введением был выбран конъюгат с наиболее удачным фармакокинетическим профилем.

Результаты

Оба конъюгата GGA и AGG были эффективно мечены ^{99m}Tc, радиохимический выход составил 82 % и 77 % соответственно, радиохимическая чистота после очистки была выше 99 %. Ассоциация конъюгатов с клетками линии SKOV3 была плавной, достигая до 99,6 % для [^{99m}Tc]Tc-G3-G3-ABD-DM1 после 6 часов инкубации. Уровень интернализированной радиоактивности для [^{99m}Tc]Tc-G3-G3-ABD-DM1 и [^{99m}Tc]Tc-ABD-G3-G3-DM1 увеличивался со временем и через 24 ч составлял 48,4 ± 7,1 % и 45,1 ± 1,4% от клеточно-ассоциированной активности соответственно. Значения равновесных констант диссоциации (K_D) были сопоставимыми и находились в наномолярном диапазоне для обоих конъюгатов. Изучение специфичности in vitro терапевтических конструкций продемонстрировало, что связывание с клетками было специфичным (рис. 1), пропорционально уровню экспрессии HER2 в клеточных линиях, при этом связанная с клетками радиоактивность значительно снижалась, когда HER2-рецепторы были предварительно насыщены (блокированы) немеченым DARPin G3. Значения специфичности связывания были немного ниже для обоих конъюгатов в присутствии ЧСА.

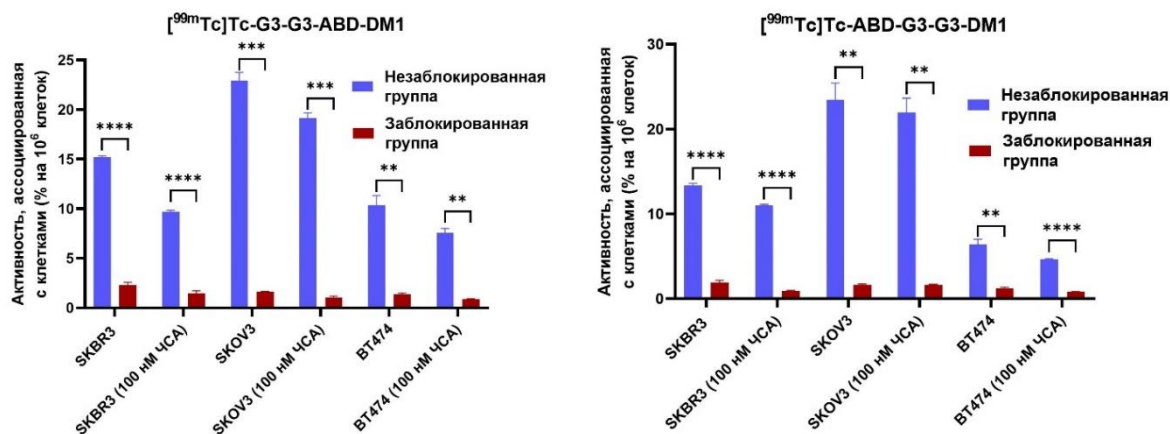


Рис. 1. Специфичность связывания конъюгатов с клетками SKBR3, SKOV3 и BT474 в присутствии и отсутствии ЧСА

Для оценки фармакокинетики, было проведено исследование биораспределения *in vivo* с использованием здоровых мышей. Исследуемые варианты продемонстрировали накопление в почках. При этом наиболее высокие показатели активности в крови и в почках были в [^{99m}Tc]Tc-G3-ABD-DM1 и [^{99m}Tc]Tc-ABD-G3-DM1, чем в бивалентных конъюгатах. В целом вариант [^{99m}Tc]Tc-G3-ABD-DM1 характеризуется более благоприятной картиной фармакокинетического профиля. Сравнивая пути внутрибрюшинного и внутривенного введения для [^{99m}Tc]Tc-G3-ABD-DM1, мы обнаружили, что, как и ожидалось, наблюдались статистические различия в поглощении в брюшной полости.

Заключение

Сконструированные белки на основе DARPIn G3, слитые с ABD и нагруженные эмтанзином, продемонстрировали специфичность связывания к HER2-экспрессирующими клеточными линиями, а аффинность обоих конъюгатов к клеткам SKOV3 была в наномолярном диапазоне. Концентрация активности бивалентных конъюгатов в крови и почках была значительно ниже, чем в моновалентных, что делает их более перспективными для дальнейшего исследования.

Список источников

1. Huang J. et al. Worldwide burden, risk factors, and temporal trends of ovarian cancer: A global study // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14, № 9 – P. 2230.
2. Coward J.I.G., Middleton K., Murphy F. New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer // *International Journal of Women's Health*. – 2015. – Vol. 7 – P. 189–203.
3. Шилова О.Н., Деев С.М. Дарпины-перспективные адресные белки для тераностики // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). – 2019. – Т. 11. – № 4 (43). – С. 42–53.
4. Kontermann R.E. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics // *Current opinion in biotechnology*. – 2011. – Vol. 22, № 6. – P. 868–876.
5. Emma von Witting, et al. Small bispecific affinity proteins for simultaneous target binding and albumin-associated half-life extension // *Molecular pharmaceuticals*. – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 328–337.
6. Vorobyeva A. et al. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of ^{99m}Tc-labeled DARPIn G3 // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 9405.