

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский  
государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова

*На правах рукописи*

Соколова Евгения Александровна

**Флуоресцирующая модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли  
яичника человека и ее использование для оценки эффективности  
таргетного иммунотоксина на основе экзотоксина А**

03.01.02 — биофизика

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:  
д.б.н., проф., чл.-корр. РАН Деев С.М.,  
Институт биоорганической химии  
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
к.б.н., доц. Балалаева И.В.,  
Национальный исследовательский Нижегородский  
государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Москва – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Флуоресцирующие модели опухолей человека.....	11
1.1.1 Флуоресцентные белки: свойства и разнообразие.....	11
1.1.2 Флуоресцентные белки в экспериментальной онкологии.....	17
1.2 Рецептор HER2 как молекулярная мишень для таргетной противоопухолевой терапии.....	25
1.2.1 Биология HER2.....	25
1.2.2 Роль HER2 в канцерогенезе.....	28
1.2.3 Таргетная терапия HER2-гиперэкспрессирующих опухолей.....	30
1.3 Иммунотоксины как агенты для таргетной противоопухолевой терапии....	34
1.3.1 Общая структура и эволюция иммунотоксинов.....	34
1.3.2 Направляющий модуль рекомбинантных иммунотоксинов.....	35
1.3.3 Токсический модуль рекомбинантных иммунотоксинов.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	50
2.1 Оборудование и материалы.....	50
2.2 Методы.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	70
3.1 Получение ксенографтной опухолевой модели на основе линии опухолевых клеток, экспрессирующих дальнекрасный флуоресцентный белок.....	70
3.2 Мониторинг развития флуоресцирующих опухолей и их ответа на терапевтическое воздействие.....	75
3.3 Рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40 и оценка его эффективности на полученной флуоресцирующей опухолевой модели.....	81
3.4 Исследование механизма действия иммунотоксина 4D5scFv-PE40.....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
ВЫВОДЫ.....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – аппарат Гольджи  
АДФ – аденозиндифосфат  
АКБ – альтернативный каркасный белок  
АТФ – аденозинтрифосфат  
ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид  
НАД<sup>+</sup> – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида  
ОЕ – оптическая единица  
ПААГ – полиакриламидный гель  
ПЭГ – полиэтиленгликоль  
РНКаза – рибонуклеаза  
СОС – стандартная ошибка среднего  
ТРО – коэффициент торможения роста опухоли  
УФ – ультрафиолет  
ЭДТА-Na<sub>2</sub> – динатриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты  
ЭПР – эндоплазматический ретикулум  
ADC – химический конъюгат полноразмерного антитела с низкомолекулярным токсическим веществом (antibody-drug conjugate)  
APS – аммония персульфат  
Arg – аргинин  
BFP – синий флуоресцентный белок (blue fluorescent protein)  
BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)  
CCD – прибор с обратной зарядовой связью (charge-coupled device)  
CFP – циановый флуоресцентный белок (cyan fluorescent protein)  
cpFP – циркулярно пермутированный (circularly permuted) флуоресцентный белок  
DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид  
DMSO – диметилсульфоксид  
dsFv – фрагмент антитела, состоящий из переменных доменов легкой и тяжелой цепей, соединенных дисульфидной связью (disulfide-stabilized fragment variable)  
DT – дифтерийный токсин  
eEF2 – эукариотический фактор элонгации трансляции 2 (eukaryotic elongation factor 2)  
EGF – эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)  
ERAD – ЭПР-опосредованная деградация белков (ER-associated degradation)  
FITC – флуоресцеин изотиоцианат, ФИТЦ  
FRET – Ферстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer)  
GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein)

Glu – глутаминовая кислота  
HER (1, 2, 3, 4) – представители семейства рецептора эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor).  
His – гистидин  
IC<sub>50</sub> – значение концентрации исследуемого вещества, при которой жизнеспособность клеток снижается в два раза относительно контроля  
Kd – равновесная константа диссоциации комплекса рецептора и лиганда  
KDEL – С-концевая аминокислотная последовательность: лизин, аспарагиновая кислота, глутамин, лейцин  
МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase)  
МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиумбромид  
OD – оптическая плотность (optical density)  
РАFP – фотоактивируемый флуоресцентный белок (photoactivatable fluorescent protein)  
PALM – фотоактивируемая локализационная микроскопия (photoactivated localization microscopy)  
PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline)  
PE – псевдомонадный экзотоксин А дикого типа (*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A)  
PI – пропидий йодистый  
PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (phosphoinositide 3-kinase)  
PMSF – фенилметилсульфонилфторид  
SDS – додецилсульфат натрия  
scFv – одноцепочечный фрагмент антитела, состоящий из переменных доменов легкой и тяжелой цепей, соединенных гибким пептидным линкером (single-chain fragment variable)  
SOI – хирургическая ортотопическая перевивка опухолевых клеток (surgical orthotopic implantation)  
TEMED – тетраметилэтилендиамин  
TGF $\alpha$  – трансформирующий фактор роста  $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ )  
ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин  
Тур – тирозин  
VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor receptor)  
V<sub>H</sub> – переменный домен тяжелой цепи антитела  
V<sub>L</sub> – переменный домен легкой цепи антитела  
YFP – желтый флуоресцентный белок (yellow fluorescent protein)  
 $\lambda_{ex}$  – длина волны возбуждения  
 $\lambda_{em}$  – длина волны флуоресценции

## ВВЕДЕНИЕ

### *Актуальность проблемы*

Таргетная терапия – современный быстро развивающийся тип персонализированного лечения злокачественных новообразований, предполагающий селективное воздействие на опухоль благодаря нацеленной доставке терапевтических агентов к опухолевым клеткам. Это становится возможным при использовании агентов, сочетающих свойства специфического узнавания опухолевой клетки и токсического действия на нее.

Развитие таргетной терапии тесно связано с прогрессом в изучении молекулярных основ канцерогенеза и идентификацией так называемых мишеней [Al-Lazikani *et al.*, 2012]. Наиболее часто мишенями таргетных агентов служат молекулы на поверхности клетки, уровень экспрессии которых в опухолевых клетках значительно выше, чем в нормальных тканях. В настоящее время успешно апробированной широко используемой мишенью для таргетной терапии некоторых типов солидных опухолей является онкомаркер HER2 – трансмембранная рецепторная тирозинкиназа, гиперэкспрессия которой связана с быстрым прогрессированием и повышенным метастатическим потенциалом опухоли [Harari *et al.*, 2000, Polanovski *et al.*, 2012, Yarden *et al.*, 2001].

Перспективными агентами для таргетной противоопухолевой терапии являются иммунотоксины, объединяющие в своем составе структурно и функционально независимые направляющий и токсический модули [Choudhary *et al.*, 2011, Kreitman, 2006]. Активная разработка и тестирование HER2-специфичных иммунотоксинов требует создания адекватных экспериментальных моделей опухолей, гиперэкспрессирующих рецептор HER2.

Важным критерием при оценке противоопухолевой эффективности потенциальных препаратов является выбор метода мониторинга экспериментальных опухолей в организме животного. Технология использования флуоресцентных белков как генетически кодируемых маркеров опухолевых клеток обусловила развитие и широкое распространение оптического флуоресцентного имиджинга в экспериментальной онкологии [Hoffman, 2016, Yang *et al.*, 2007]. Признанными достоинствами этого метода являются высокая чувствительность и относительно низкая стоимость оборудования в сочетании с достаточным для терапевтического мониторинга разрешением. Для прижизненного флуоресцентного имиджинга экспериментальных опухолей наибольший интерес представляют красные и дальне-красные флуоресцентные белки, спектры излучения которых попадают в «терапевтическое окно прозрачности» биоткани [Hoffman, 2008, Massoud *et al.*, 2003, Shcherbo *et al.*, 2007].

В связи с этим, получение флуоресцирующих моделей опухолей с гиперэкспрессией рецептора HER2 и их использование для изучения противоопухолевого эффекта разрабатываемых таргетных агентов является актуальной задачей в области биомедицины.

### *Цели и задачи работы*

Цель работы заключалась в получении флуоресцирующей модели HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека и ее использовании для изучения эффективности созданного HER2-специфичного иммунотоксина.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека с флуоресценцией в красной области спектра;

2. Апробировать полученную флуоресцирующую модель для оценки противоопухолевой эффективности препаратов;
3. Создать иммунотоксин на основе псевдомонадного экзотоксина А и HER2-специфичного антитела формата scFv;
4. Изучить механизмы цитотоксического действия иммунотоксина.

### *Научная новизна*

Впервые создана ксенографтная модель аденокарциномы яичника человека, характеризующаяся гиперэкспрессией рецептора HER2 и стабильной экспрессией дальнекрасного флуоресцентного белка Katushka, спектр эмиссии которого лежит в области терапевтического окна прозрачности биологических тканей. Показана высокая информативность созданной модели для прижизненной визуализации опухоли в организме животного неинвазивным методом флуоресцентного имиджинга и продемонстрированы возможности ее использования для высокоэффективной оценки действия противоопухолевых агентов.

Впервые получен рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40, содержащий в составе анти-HER2 антитело 4D5scFv и фрагмент псевдомонадного экзотоксина А. С использованием созданной флуоресцирующей опухолевой модели показан выраженный противоопухолевый эффект иммунотоксина 4D5scFv-PE40 *in vivo*. Установлен механизм избирательного цитотоксического действия 4D5scFv-PE40: показано аффинное и высокоизбирательное связывание иммунотоксина с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток, клатрин-опосредованная интернализация и распределение в компартментах клетки, характерное для молекулы псевдомонадного экзотоксина А дикого типа, ингибирование биосинтеза белка и последующая гибель клеток по пути апоптоза.

### *Научно-практическая значимость*

Созданная и апробированная ксенографтная флуоресцирующая модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека может быть широко использована для оценки противоопухолевого потенциала соединений различного механизма действия, в том числе таргетных HER2-специфичных агентов, а также для исследований процессов развития опухоли в организме с помощью неинвазивного высокоинформативного флуоресцентного имиджинга. Полученный и исследованный рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40 представляет интерес в качестве потенциального агента для таргетной терапии HER2-гиперэкспрессирующих опухолей и в перспективе может быть включен в схемы терапии этой группы новообразований. Основные выводы и результаты работы будут использованы в учебном процессе при разработке соответствующих спецкурсов для студентов биологических и медицинских факультетов вузов.

### *Личный вклад автора*

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах.

На начальных этапах получения линии клеток SKOV-kat большой вклад внесли сотрудники лаборатории молекулярной иммунологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ) РАН.

Плазмида pSD-4D5scFv-PE40, содержащая ген иммунотоксина 4D5scFv-PE40, предоставлена лабораторией молекулярной иммунологии ИБХ РАН.

Анализ аффинности полученного рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 проведен сотрудниками данной лаборатории.

Морфологический анализ образцов опухолевой ткани проведен в Отделе морфологии Центральной научно-исследовательской лаборатории Нижегородской государственной медицинской академии. Иммуногистохимический анализ экспрессии рецептора HER2 в опухолевой ткани проведен в Нижегородской областной клинической больнице им. Н.А. Семашко.

### *Апробация работы*

Основные результаты работы были представлены на следующих международных и всероссийских конференциях: международной школе-конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века» (Пушино, 2011, 2015); XII международной школе для молодых ученых и студентов по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting — SFM» (Саратов, 2011); 14 конгрессе Европейского общества фотобиологов «14th Congress of European society for photobiology» (Женева, 2011); международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics» (С. Петербург — Н. Новгород, 2011); VI Съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, 2011); школе по фотобиологии Европейского общества фотобиологов ESP Photobiology School (Бриксен, Италия, 2012); IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); V Всероссийском с международным участием медико-биологическом Конгрессе молодых ученых "Симбиоз-Россия 2012" (Тверь, 2012); международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию ИБХ РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014); VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015); 69-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2016).

### *Публикации*

По теме диссертации опубликована 21 работа, из них 7 статей в реферируемых журналах, входящих в перечень ВАК, 1 патент на изобретение и 13 тезисов в сборниках всероссийских и международных конференций.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Флуоресцирующие модели опухолей человека

#### 1.1.1 Флуоресцентные белки: свойства и разнообразие

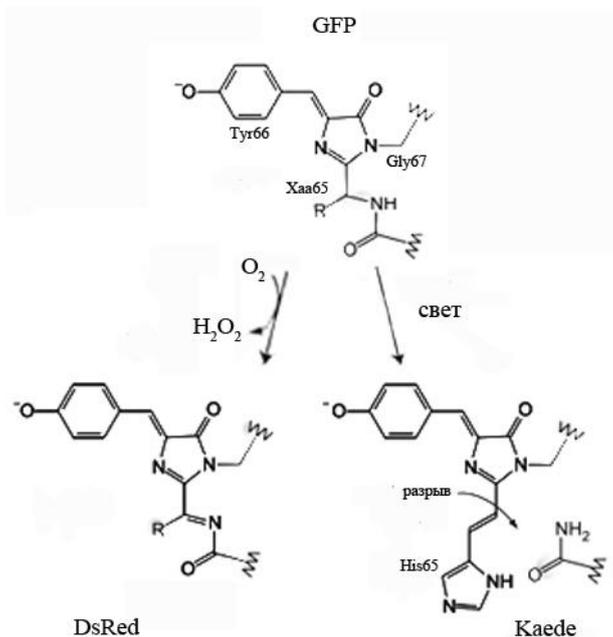
Животные модели опухолей человека являются неотъемлемой частью исследований в области экспериментальной онкологии. Важным вопросом при использовании опухолевых моделей является выбор метода их мониторинга. В настоящее время существуют различные методы прижизненного имиджинга экспериментальных опухолей, оптимизированные для исследований на небольших животных (мышях), среди которых: магнитно-резонансный имиджинг, оптический флуоресцентный имиджинг, позитронно-эмиссионная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография. Оптимальным методом имиджинга для задач экспериментальной онкологии является оптический флуоресцентный имиджинг. Данный метод характеризуется высокой чувствительностью и относительно низкой стоимостью оборудования в сочетании с достаточным для терапевтического мониторинга разрешением. Кроме того, в основе метода лежит использование неповреждающего излучения видимого или ближнего инфракрасного диапазона, что является преимуществом с точки зрения длительного мониторинга [Massoud *et al.*, 2003, Weissleder, 2002].

Для визуализации опухолевых клеток методом оптического флуоресцентного имиджинга широко используются генетически кодируемые флуорофору – флуоресцентные, или GFP-подобные, белки (*англ.* GFP, green fluorescent protein – зеленый флуоресцентный белок). GFP-подобные белки представляют собой компактные глобулы с молекулярной массой около 25 кДа и первичной последовательностью из 220-240 аминокислот. Для всех GFP-подобных белков характерна третичная структура типа  $\beta$ -бочонок, образованная 11  $\beta$ -тяжами, внутри которой проходит осевая  $\alpha$ -спираль, несущая

хромофор [Henderson *et al.*, 2005, Loening *et al.*, 2007, Ormo *et al.*, 1996, Petersen *et al.*, 2003, Yarbrough *et al.*, 2001]. Сформированный  $\beta$ -бочонок обеспечивает необходимую пространственную организацию фрагмента, формирующего хромофор. Уникальной особенностью флуоресцентных белков является способность образовывать хромофор из участка собственной аминокислотной последовательности (а.о. 65-67, рис. 1) в процессе посттрансляционного автокатализа, что делает использование таких белков независимым от дополнительных ферментов и кофакторов. Для формирования и функционирования хромофора большое значение имеет нековалентное взаимодействие хромофора с аминокислотными остатками  $\beta$ -тяжей за счет образования водородных связей. Важнейшими остатками, обеспечивающими автокатализ, являются Arg96 и Glu222, а остатки в позициях 148, 165, 167 и 203 влияют на протонирование, пространственную конформацию и подвижность хромофора, в итоге определяя спектральные свойства белка [Chudakov *et al.*, 2010]. Кроме этого, структура  $\beta$ -бочонка защищает зрелый хромофор от действия протеаз и денатурирующих агентов, предотвращая тушение флуоресценции. Флуоресценция GFP-подобных белков характеризуется стабильностью и высокими значениями квантового выхода [Tsien, 1998].

Природное разнообразие флуоресцентных белков по их спектральным свойствам (табл. 1) во многом обусловлено строением хромофоров. Выделяют три наиболее часто встречающихся типа хромофоров. GFP-подобный хромофор представляет собой планарную систему конъюгированных  $\pi$ -связей, образованную путем циклизации аминокислотной последовательности по остаткам 65 и 67 с последующим дегидрированием остатка Tyr66 по связи C $\alpha$ -C $\beta$  (рис. 1). В структуре красного DsRed-подобного хромофора система  $\pi$ -связей расширяется за счет дополнительного окисления связи C $\alpha$ -N остатка 65, приводя к значительному сдвигу спектров возбуждения и эмиссии в красную область (рис. 1). Интересными представителями красных Ds-Red-подобных белков являются так называемые «таймеры», в процессе созревания которых

наблюдается сдвиг спектра флуоресценции из зеленой в красную область, с сохранением пика более коротковолнового излучения в зрелом состоянии [Labas *et al.*, 2002]. Для созревания красного Kaede-подобного хромофора необходимо облучение: в темноте Kaede-подобные белки имеют GFP-подобный хромофор, в то время как после облучения УФ происходит разрыв последовательности между C $\alpha$  и амидным атомом N остатка His65 и формирование двойной связи между атомами C $\alpha$ -C $\beta$  остатка His65 (рис. 1). Эта особенность лежит в основе использования Kaede-подобных белков в качестве фотоактивируемых флуоресцентных меток [Chudakov *et al.*, 2010, Gross *et al.*, 2000, Yarbrough *et al.*, 2001]. Для нефлуоресцирующих GFP-подобных белков (хромопротеинов) характерна непланарная *trans*-конформация хромофора. Помимо химического строения хромофоров, спектральное разнообразие природных флуоресцентных белков обеспечивается также за счет влияния аминокислотного состава и молекул воды микроокружения хромофора [Matz *et al.*, 1999].



**Рисунок 1.** Структуры основных типов хромофоров природных GFP-подобных белков (адаптировано из [Chudakov *et al.*, 2010]).

Таблица 1.

Основные спектральные классы природных GFP-подобных белков (по данным [Labas *et al.*, 2002, Matz *et al.*, 1999, Shkrob *et al.*, 2008, Yampolsky *et al.*, 2008])

Класс	Тип хромофора	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм
Синие (циановые)	GFP-подобный, планарный	≈450	485
Зеленые	GFP-подобный, планарный	480-510	500-520
Красные	Ds-Red-подобный, планарный	560-580	570-610
«Таймеры»	Ds-Red-подобный, планарный	ранняя форма	506-508
		поздняя форма	566-572
Фотопереключаемые	Kaede-подобный, планарный	560-580	570-610 620-630
Хромопротеины	непланарный	560-610	–

Интенсивное изучение молекулярной структуры флуоресцентных белков позволило определить связь между строением хромофора и его микроокружением и параметрами флуоресценции, что легло в основу создания большого разнообразия мутантных форм флуоресцентных белков со свойствами, оптимизированными для различных биологических приложений. Так, для повышения эффективности сворачивания GFP при 37°C была создана его улучшенная мутантная форма – EGFP (*англ.* enhanced – улучшенный) [Cormack *et al.*, 1996]. В целях расширения спектрального разнообразия флуоресцентных белков на основе GFP также было создано несколько классов мутантов: YFPs (желтые), CFPs (циановые) и BFPs (синие) [Tsien, 1998]. Кроме этого, для решения проблемы олигомеризации природных флуоресцентных белков, затрудняющей их использование в клеточной биологии, был получен спектральный ряд разнообразных мономерных мутантов (с максимумами спектров флуоресценции от 424 до 650 нм), обладающих также улучшенными

параметрами созревания, яркой флуоресценцией и фотостабильностью [Chudakov *et al.*, 2010, Shaner *et al.*, 2004]. Отдельную группу мономерных белков составляют так называемые «белки с большим стоксовым сдвигом», протонированный хромофор которых при возбуждении переходит в анионную форму и излучает в более длинноволновой области, по сравнению с исходной протонированной формой. Наибольший стоксовый сдвиг характерен для белка mKeima с максимумами возбуждения и флуоресценции при 440 и 620 нм, соответственно [Kogure *et al.*, 2006]. Использование таких белков может быть удобным, в частности, для многоцветного мечения внутриклеточных структур [Kogure *et al.*, 2008, Piatkevich *et al.*, 2010].

Отдельный интересный класс флуоресцентных белков представляют фотоактивируемые флуоресцентные белки (*англ.*, PAFPs – photoactivatable fluorescent proteins), полученные на основе многих GFP-подобных белков. Такие белки способны к обратимому или необратимому изменению спектральных свойств при облучении светом определенной длины волны (фотоконверсия/фотоактивация) [Chudakov *et al.*, 2010]. Так, получен ряд Kaede-подобных необратимых PAFPs, изменяющих цвет флуоресценции с зеленого ( $\lambda_{em}$  510-520 нм) на красный ( $\lambda_{em}$  570-590 нм) при облучении УФ, среди которых наиболее интересны в практическом отношении мономеры mEos2 [McKinney *et al.*, 2009] и Dendra2 [Gurskaya *et al.*, 2006]. К необратимым PAFPs относятся также мономерные белки на основе красного флуоресцентного белка mCherry, переходящие из нефлуоресцентной в флуоресцентную форму ( $\lambda_{ex}$  570 нм,  $\lambda_{em}$  596 нм) при облучении УФ [Subach *et al.*, 2009]. Представителями обратимых PAFPs, изменяющих спектральные свойства за счет обратимой *cis-trans* изомеризации хромофора, являются «разгорающиеся» (красные KFP1, rsCherry, rsCherryRev) и «затухающие» (зеленый Dronpa, циановый mTFP07) белки [Chudakov *et al.*, 2010]. Спектр применений PAFPs довольно широк и включает исследование перемещений и деградации белков в клетке, передвижения и взаимодействия клеток, а также

технологии микроскопии сверхвысокого разрешения, в частности, фотоактивируемой локализационной микроскопии (*англ.*, PALM – photoactivated localization microscopy) [Chudakov *et al.*, 2010].

Наконец, флуоресцентные белки открывают возможности создания на их основе генетически-кодируемых сенсоров, обеспечивающих мониторинг изменений концентрации аналитов, активности ферментов, конформационных изменений белков, что на уровне клетки и организма позволяет исследовать сигнальные пути, межклеточные взаимодействия, ответ клеток на различные воздействия. Разработано несколько подходов к созданию сенсоров на основе флуоресцентных белков. Свойственная практически всем флуоресцентным белкам зависимость спектральных свойств от pH позволила получать pH-сенсоры без введения дополнительных pH-чувствительных доменов в структуру белка [Kneen *et al.*, 1998]. С точки зрения практического применения наибольший интерес представляют ратиометрические pH-сенсоры, для которых свойственно изменение соотношения интенсивности пиков флуоресценции при возбуждении на двух длинах волн в ответ на изменение pH, что исключает зависимость измерений от концентрации сенсора и других варьирующих параметров (например, pHluorin [Miesenbock *et al.*, 1998]). Другой подход к получению сенсоров основан на слиянии флуоресцентного белка с одним или несколькими сенсорными доменами белковой природы. При получении таких конструкций дополнительные домены вводят в непосредственной близости от хромофора. Для этого, в частности, модифицируют первичную структуру флуоресцентного белка с получением так называемого «циркулярно пермутьированного» варианта (cpFP), в котором нативные N- и C-концы белка (изолированные от хромофора) слиты друг с другом с помощью линкера, а новые концы искусственно образованы в другой части молекулы [Carlson *et al.*, 2010]. Подобным образом созданы сенсоры на кальций (Pericam, GCaMP2 и др.) и пероксид водорода (HyPer) [Belousov *et al.*, 2006, Nagai *et al.*, 2001, Tallini *et al.*, 2006]. Еще один тип сенсоров основан на использовании явления

Ферстеровского резонансного переноса энергии (*англ.*, FRET – Förster resonance energy transfer). В частности, два флуоресцентных белка, составляющие FRET-пару, могут быть слиты с одним белком, претерпевающим конформационные изменения в ходе изучаемого процесса, что приводит к изменению расстояния между флуоресцентными белками и, соответственно, спектральных свойств FRET-пары [Hochreiter *et al.*, 2015].

Таким образом, уникальные свойства и многообразие спектральных форм флуоресцентных белков делают их привлекательными для использования в качестве генетически кодируемых меток для визуализации различных процессов *in vitro* и *in vivo*, в том числе для прижизненного мониторинга роста и развития опухоли.

### 1.1.2 Флуоресцентные белки в экспериментальной онкологии

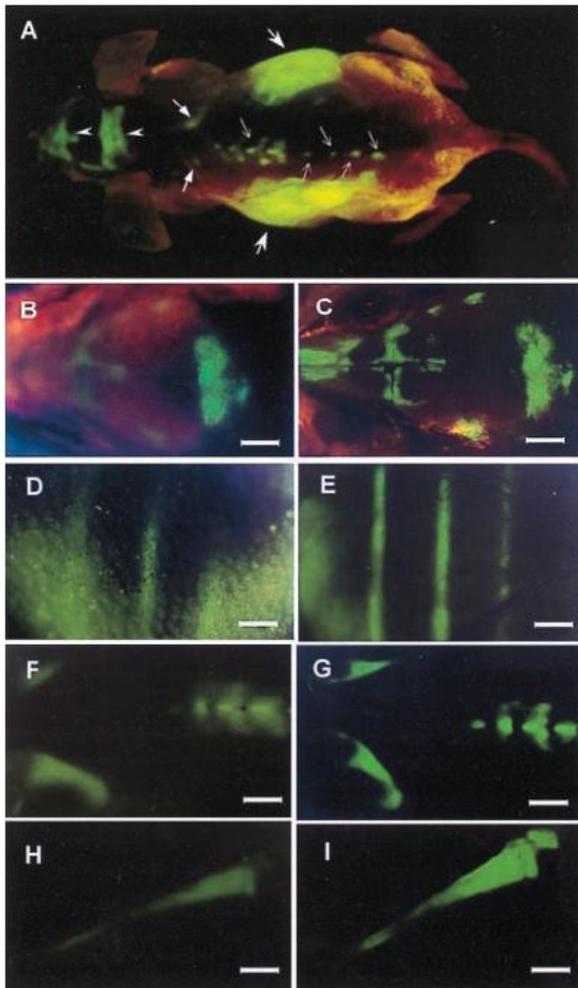
Оптический биоимиджинг опухолевого процесса с использованием флуоресцентных белков имеет ряд преимуществ по сравнению с другими оптическими методами [Hoffman, 2005, Hoffman *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2000]: (1) отсутствие необходимости введения животному-опухоленосителю дополнительных субстратов; (2) устойчивость флуоресценции к факторам внешней среды; (3) возможность обнаружения метастазов, образовавшихся из первичного опухолевого узла; (4) возможность многоцветного мечения; (5) использование сравнительно простого оборудования для детекции сигнала флуоресценции.

Начало исследованиям в этом направлении было положено группой американских ученых под руководством Роберта Хоффмана в 1997 году, когда GFP ( $\lambda_{em}$  508 нм) был впервые использован для визуализации *in vivo* опухоли человека, трансплантированной иммунодефицитному животному [Chishima *et al.*, 1997]. Позднее GFP стал использоваться в качестве маркера опухолевых клеток в ортотопических моделях (SOI). Метод SOI (*англ.*, surgical orthotopic implantation) подразумевает перевивку опухолевых клеток или фрагментов

опухолевой ткани непосредственно в орган происхождения исследуемой опухоли, тем самым приближая патологический фенотип опухоли к клиническому и позволяя, в частности, более достоверно оценивать ответ опухоли на терапевтическое воздействие. С помощью GFP были созданы флуоресцирующие ортотопические модели опухолей человека и животных (опухоль простаты, легкого, яичника и др.), а также модели костных метастазов [Hoffman, 1999, Yang *et al.*, 2003].

В 2000 г. GFP был впервые использован для так называемого «whole-body» имиджинга, т.е. неинвазивного получения изображения внутренних органов целого животного методом флуоресцентного имиджинга [Yang *et al.*, 2000]. Было обнаружено высокое соответствие изображений опухоли, полученных на животном *in vivo* и после вскрытия, что говорит об эффективности использования этого подхода (рис. 2). Было также оценено, насколько «чувствительность» данного подхода снижается с увеличением глубины расположения опухоли: на глубине 0,5 мм минимальный для визуализации диаметр опухоли составлял  $\approx 60$  мкм, в то время как на глубине 2,2 мм возможно было визуализировать опухоль не менее 1,86 мм.

На основе GFP были созданы ортотопические модели карцином простаты, молочной и поджелудочной желез, и показана возможность визуализации процесса ангиогенеза в опухоли на уровне целого организма [Yang *et al.*, 2001]. В работе [Bouvet *et al.*, 2002] на полученных ортотопических моделях карцином поджелудочной железы человека, экспрессирующих GFP, был проведен прижизненный мониторинг роста первичных опухолей и метастазов в селезенке, кишечнике и сальнике по изменению площади флуоресцирующей зоны.

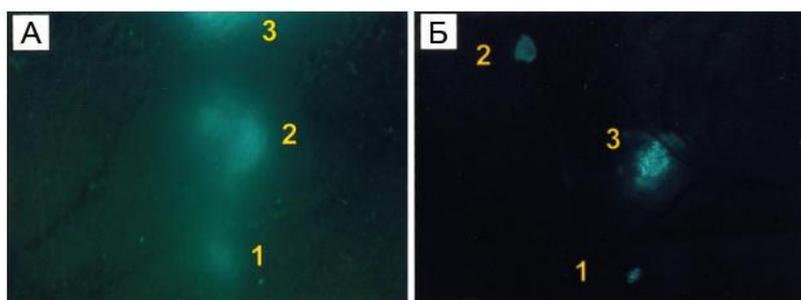


**Рисунок 2.** Whole-body имиджинг костных метастазов карциномы кишечника AC3488 (опухолевые клетки экспрессируют GFP). Показаны: прижизненное чрезкожное изображение опухолей в скелетной системе (в черепе, лопатках, позвоночнике) и в печени (A); ряд чрезкожных флуоресцентных изображений метастазов в черепе, ребрах, позвоночнике и большеберцовой кости (B, D, F, H) в сравнении с соответствующими изображениями метастазов на вскрытом животном *ex vivo* (C, E, G, I) [Yang *et al.*, 2000]

Известно также несколько работ с использованием флуоресцентных белков со спектром флуоресценции в более длинноволновой области для мечения опухолевых клеток. Так, флуоресцентный белок DsRed2 ( $\lambda_{em}$  588 нм) был использован при моделировании легочных метастазов остеосаркомы человека [Kimura *et al.*, 2012], а также при создании ортотопической модели карциномы поджелудочной железы человека для количественной оценки развития опухоли в ответ на действие терапии [Katz *et al.*, 2003]. В последнем случае была показана высокая корреляция площади флуоресцирующей зоны на изображениях вскрытого животного, получаемых методом поверхностного флуоресцентного имиджинга, с объемом опухолевого узла.

Несмотря на перечисленные успехи неинвазивной визуализации опухоли *in vivo*, использование флуоресцентных белков с максимумом излучения менее

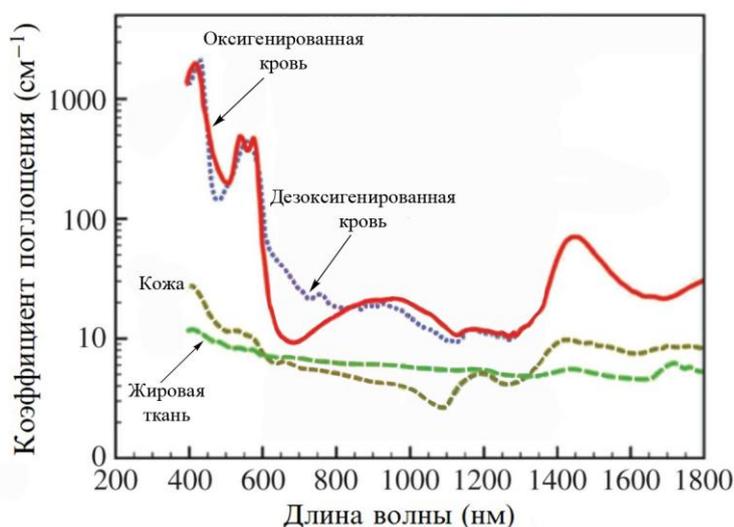
600 нм весьма ограничено в силу оптических свойств биологической ткани: сильного поглощения и рассеяния синего и зеленого света, а также ярко выраженной автофлуоресценции в данной области спектра. Данные особенности являются причиной низких значений интенсивности целевого сигнала флуоресценции, регистрируемого на интактном животном методом поверхностного имиджинга, и, в связи с этим, малого контраста получаемых изображений, а также размытия области флуоресцирующей опухоли на изображениях (рис. 3). Это значительно искажает результаты имиджинга, в частности, приводит к некорректному определению площади опухоли и интенсивности флуоресцентного сигнала [Chaudhuri *et al.*, 2001, Puaux *et al.*, 2011, Winnard *et al.*, 2006].



**Рисунок 3.** Поверхностный флуоресцентный имиджинг GFP-экспрессирующей ксенографтной карциномы яичника человека, привитой внутрибрюшинно, прижизненно (А) и после удаления брюшной стенки (Б). Опухолевые узлы отмечены цифрами (адаптировано из [Chaudhuri *et al.*, 2001]).

Поглощение и рассеяние света, определяющие его проникновение в биологическую ткань, сильно зависят от длины волны. Поглощение видимого света биотканью достаточно велико (значения коэффициента поглощения  $\mu_a$  – до  $10^4 \text{ см}^{-1}$  [Тучин, 2013], рис. 4) и обусловлено присутствием таких хромофоров, как меланин, порфирин-содержащие белки (глобины, каталаза, пероксидаза, цитохромы), флавины. По этой причине глубина проникновения света данной области не превышает 2,5 мм. В дальнекрасной и ближней инфракрасной областях спектра (600-1450 нм) поглощение существенно снижается, что обуславливает проникновение света на глубину до 10 см

[Тучин, 2013]. Кроме того, более длинноволновый свет меньше рассеивается биотканью: с увеличением длины волны от 400 до 1100 нм коэффициент рассеяния  $\mu_s$  монотонно снижается до значений менее  $10^2 \text{ см}^{-1}$  [Sandell *et al.*, 2011, Тучин, 2010]. Наконец, автофлуоресценция биоткани, обусловленная рядом эндогенных флуорофоров (флавиновыми соединениями, пиримидиновыми нуклеотидами, порфирин-содержащими молекулами), также значительно ниже в красной области спектра, по сравнению с сине-зеленой [Leblond *et al.*, 2010, Richards-Kortum *et al.*, 1996].



**Рисунок 4.** Спектры коэффициентов поглощения биотканей в видимой и инфракрасной областях спектра (адаптировано из [Garcia *et al.*, 2013]).

Таким образом, оптимальный способ увеличить глубину детектирования сигнала и повысить соотношение сигнал/фон заключается в использовании флуоресцентных белков, поглощающих и излучающих в красной или ближней инфракрасной областях спектра (так называемое «терапевтическое окно прозрачности» биоткани,  $\approx 600-1000 \text{ нм}$  [Richards-Kortum *et al.*, 1996]). Методом поверхностного флуоресцентного имиджинга такие флуорофоры могут быть детектированы на глубине до 1 см, что является достаточным для корректной визуализации небольших поверхностных опухолей, привитых мелкому лабораторному животному [Weissleder, 2002].

Благодаря прогрессу в области технологии флуоресцентных белков, сопровождающемуся как получением мутантных белков, так и поиском

природных дальне-красных белков, к настоящему моменту известен ряд наиболее «красных» GFP-подобных белков с максимумом флуоресценции более 610 нм (табл. 2). Некоторые из перечисленных белков были использованы для визуализации опухоли *in vivo*. В работе [Christensen *et al.*, 2015] белок E2-Crimson [Strack *et al.*, 2009] был использован для томографической флуоресцентной визуализации подкожной модели карциномы молочной железы человека, при этом интенсивность флуоресценции опухоли хорошо коррелировала с внешним объемом (коэффициент корреляции Пирсона  $r_p$  0,87) и весом ( $r_p$  0,95) опухолевого узла. Флуоресцентный белок TurboFP635 (Katushka) [Shcherbo *et al.*, 2007] был успешно использован для создания флуоресцирующей модели эпидермоидной карциномы человека и количественного мониторинга ее роста на фоне действия химио- и таргетной терапии методом поверхностного флуоресцентного имиджинга [Pardo *et al.*, 2012].

Важным свойством флуоресцентного белка, определяющим успешность его использования для прижизненного имиджинга опухоли в организме модельного животного, является яркость флуоресценции. Среди существующих на сегодняшний день красных флуоресцентных белков Katushka и его варианты [Luker *et al.*, 2015, Shcherbo *et al.*, 2007, Shcherbo *et al.*, 2009] обладают оптимальным сочетанием высокой интегральной яркости и флуоресценции в области «терапевтического окна прозрачности» биоткани. Кроме того, TurboFP635 характеризуется быстрым созреванием, фотостабильностью и нетоксичностью, что в целом делает данный белок перспективным для использования в качестве флуоресцентного маркера для визуализации опухолевых клеток на уровне целого организма и длительного мониторинга опухолевого роста.

Стоит отметить, что в результате разработок последних лет появилась группа так называемых «инфракрасных флуоресцентных белков», максимум излучения которых лежит правее 700 нм, – несколько вариантов белков IFR

[Shu *et al.*, 2009, Yu *et al.*, 2014], iRFP702 и iRFP713 [Filonov *et al.*, 2011, Shcherbakova *et al.*, 2013] Эти белки представляют собой производные бактериофитохромов и содержат в качестве хромофора молекулу биливердина IV $\alpha$ , что принципиально отличает их от GFP-подобных флуоресцентных белков, не имеющих в составе простетических групп и кофакторов. Существующие на данный момент инфракрасные флуоресцентные белки значительно уступают GFP-подобным красным белкам в яркости. Тем не менее, некоторые из них продемонстрировали возможность эффективной визуализации опухоли *in vivo* на уровне целого организма [Hock *et al.*, 2014, Jiguet-Jiglaire *et al.*, 2014, Tanaka *et al.*, 2016, Yu *et al.*, 2014].

Таблица 2.

## Разнообразие красных GFP-подобных белков

Название белка	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм	Квантовый выход	Молярный коэффициент экстинкции, $M^{-1}cm^{-1}$	Яркость*, отн. ед.	Ссылка
mCherry	587/610	0,22	72000	15,8	[Shaner <i>et al.</i> , 2004]
mRaspberry	598/625	0,15	86000	12,9	[Wang <i>et al.</i> , 2004]
mKate2	588/633	0,40	62500	25	[Shcherbo <i>et al.</i> , 2009]
Katushka2S	588/633	0,44	67000	29,5	[Luker <i>et al.</i> , 2015]
mKate	588/635	0,33	45000	14,9	[Shcherbo <i>et al.</i> , 2007]
TurboFP635 (Katushka)	588/635	0,34	65000	22,1	[Shcherbo <i>et al.</i> , 2007]
mNeptune2.5	599/643	0,28	95000	26,6	[Chu <i>et al.</i> , 2014]
E2-Crimson	605/646	0,12	58500	7,0	[Strack <i>et al.</i> , 2009]
mPlum	590/649	0,10	41000	4,1	[Wang <i>et al.</i> , 2004]
mNeptune	600/650	0,18	57500	13,4	[Lin <i>et al.</i> , 2009]
eqFP650	592/650	0,24	65000	15,6	[Shcherbo <i>et al.</i> , 2010]
mNeptune2	599/651	0,24	89000	21,4	[Chu <i>et al.</i> , 2014]
TagRFP657	611/657	0,10	34000	3,4	[Morozova <i>et al.</i> , 2010]
mCardinal	604/659	0,19	87000	16,5	[Chu <i>et al.</i> , 2014]
eqFP670	605/670	0,06	70000	4,2	[Shcherbo <i>et al.</i> , 2010]
mGarnet	598/670	0,09	95000	8,6	[Hense <i>et al.</i> , 2015]
TagRFP675	598/675	0,08	46000	3,7	[Piatkevich <i>et al.</i> , 2013]
mNeptune681	604/681	0,04	38000	1,5	[Li <i>et al.</i> , 2016]
mNeptune684	604/684	0,03	39000	1,2	[Li <i>et al.</i> , 2016]

\*- произведение квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента экстинкции, разделенное на 1000

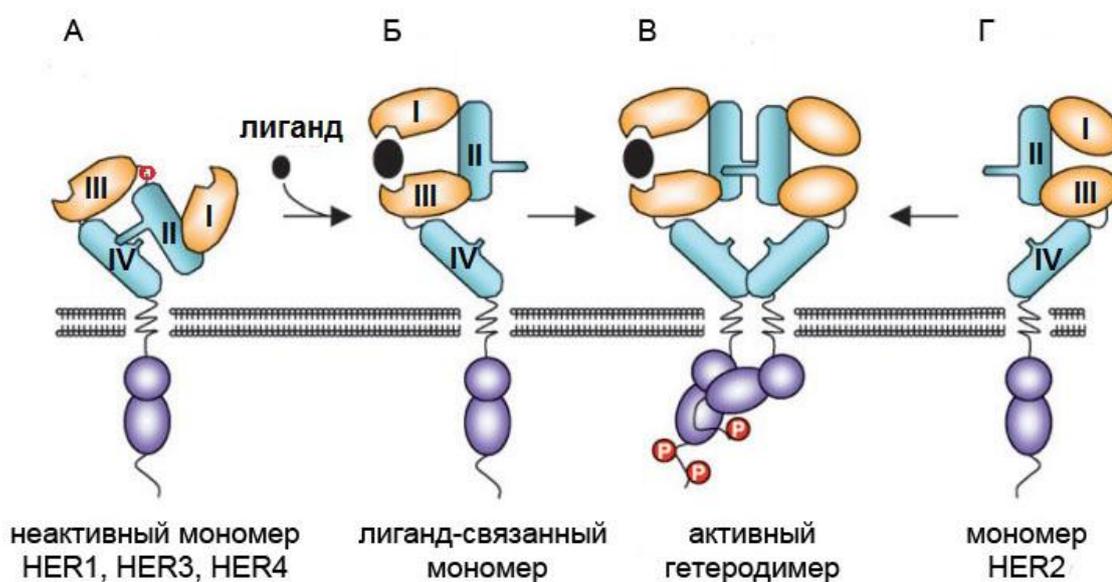
## 1.2 Рецептор HER2 как молекулярная мишень для таргетной противоопухолевой терапии

### 1.2.1 Биология HER2

Рецептор HER2 (*англ.*, human epidermal growth factor receptor 2) относится к рецепторным тирозинкиназам семейства рецептора эпидермального фактора роста человека (наряду с рецепторами HER1 (EGFR), HER3 и HER4). Рецепторы семейства HER активируют системы передачи митогенного сигнала, в частности, опосредованные метаболизмом фосфатидилинозитола (путь PI3K/Akt) и G-белком Ras (путь Ras/Raf/MEK/MAPK). В норме сложная сеть сигнальной трансдукции, запускаемая рецепторами HER, обеспечивает контроль пролиферации и дифференцировки клеток, регулирует клеточную адгезию и апоптоз. В то же время, нарушения на разных уровнях этой сети лежат в основе злокачественной трансформации клеток [**Polanovski et al., 2012**].

Структура белков семейства HER типична для рецепторных тирозинкиназ и представлена тремя доменами: внеклеточным (рецепторным) N-концевым доменом, трансмембранным доменом и внутриклеточным (тирозинкиназным) C-концевым доменом. Внеклеточный домен, в свою очередь, состоит из 4 субдоменов (I – IV), способных менять взаимную ориентацию в ответ на связывание лиганда (рис. 5). В отсутствие лиганда внеклеточный домен находится в закрытой конформации (*англ.*, tethered), поддерживаемой внутримолекулярными дисульфидными связями между цистеин-богатыми субдоменами II и IV, что обуславливает мономерное (неактивное) состояние рецептора. Сайт связывания лиганда формируется субдоменами I и III, в связи с чем взаимодействие с лигандом индуцирует их сближение и переход внеклеточного домена в открытую конформацию (*англ.*, extended), при этом нарушается связь доменов II и IV и изменяется взаимная ориентация доменов II и III. Такая перестройка приводит к экспонированию участков доменов II и IV, необходимых для димеризации с

рецептором-партнером, также находящимся в открытой конформации. В ответ на димеризацию происходит изменение конформации киназного домена (активация) и автофосфорилирование С-концевых остатков тирозина. Фосфотирозины киназных доменов рецепторов служат отправной точной передачи сигнала в клетку, являясь сайтами связывания адаптерных белков, содержащих домены SH2 (Src homology-2) или PBD (phosphotyrosine-binding domain) [Burgess *et al.*, 2003, Lemmon, 2009].



**Рисунок 5.** Структура и конформационные перестройки рецепторов семейства HER. Представлены: неактивный мономер рецептора HER1/HER3/HER4 в закрытой конформации (А), мономер в открытой конформации после связывания лиганда (Б), активированный (фосфорилированный) гетеродимер (В) и мономер HER2, всегда находящийся в открытой конформации (Г). Римскими цифрами обозначены субдомены внеклеточного домена рецепторов (I – IV). Красным кольцом на рисунке (А) показана ось поворота доменов I и II относительно доменов III и IV при связывании лиганда (адаптировано из [Wieduwilt *et al.*, 2008]).

В структурном отношении рецептор HER2 отличается от других представителей семейства. Во внеклеточном домене HER2 обнаружено несколько аминокислотных замен в позициях, обеспечивающих взаимодействие субдоменов II и IV рецепторов HER1 и HER3, в то время как

субдомены I и III, наоборот, стабильно контактируют друг с другом. Таким образом, HER2 имеет постоянную открытую конформацию, не зависящую от взаимодействия с лигандом, то есть находится в активном (готовом к димеризации) состоянии. Эти структурные особенности хорошо согласуются с тем фактом, что природного лиганда HER2 не найдено. Рецептор HER2 рассматривается как корецептор, в норме образующий функционально активные гетеродимеры с другими белками семейства HER после их активации соответствующими лигандами – эпидермальным фактором роста EGF и трансформирующим фактором роста TGF $\alpha$  в случае гетеродимеризации с HER1 или нейрегулинами в случае гетеродимеризации с HER3 или HER4 [Rubin *et al.*, 2001].

Рецептор HER2 как партнер гетеродимеризации играет очень важную роль в передаче сигнала. Обнаружено, в частности, что гетеродимеры с HER2 характеризуются большей аффинностью связывания лиганда за счет более медленной диссоциации комплекса рецептора с лигандом. Кроме того, HER2 замедляет интернализацию гетеродимерного комплекса и/или ускоряет его рециклирование на поверхность клетки, предотвращая лизосомальную деградацию [Harari *et al.*, 2000, Hendriks *et al.*, 2003, Rubin *et al.*, 2001]. Перечисленные свойства HER2 обуславливают его устойчивость к регуляции по типу отрицательной обратной связи и были обнаружены довольно давно [Baulida *et al.*, 1996, Lenferink *et al.*, 1998], однако, их молекулярные механизмы до сих пор до конца не ясны. Так, предполагается механизм стабилизации HER2 на мембране за счет связи с белками, содержащими PZD-домен (например, эрбином [Tao *et al.*, 2014]). Кроме этого, для HER2 характерно слабое взаимодействие с убиквитин-лигазой Cbl1, которая необходима для эффективной интернализации и деградации лиганд-активированного (автофосфорилированного) HER1 [Harari *et al.*, 2000]. Важным критерием стабильности HER2 также является взаимодействие с шапероном Hsp90: ингибирование Hsp90 гелданамицином приводит к

диссоциации его комплекса с киназным доменом HER2 и делает доступными сайты узнавания убиквитин-лигазами с последующей интернализацией, убиквитинилированием и деградацией рецептора [Xu *et al.*, 2001].

Стоит отметить, что вклад этих разнообразных факторов, влияющих на оборот HER2 в клетке и, соответственно, на его функциональную активность, может зависеть от типа клеток и от уровня экспрессии рецептора.

В целом, указанные особенности обеспечивают большую продолжительность передачи сигнала от содержащих HER2 гетеродимеров, что в итоге приводит к более эффективной активации митогенных сигнальных каскадов, чем в случае гомодимеров остальных представителей семейства.

### **1.2.2 Роль HER2 в канцерогенезе**

Нарушение структуры и функционирования рецептора HER2 сопровождается развитием ряда опухолей эпителиального происхождения. Основными механизмами возникновения таких нарушений являются соматические мутации и амплификация гена, приводящая к гиперэкспрессии рецептора.

Мутации в виде небольших вставок или делеций могут затрагивать как киназный, так и внеклеточный домен рецептора. Мутации киназного домена встречаются в 2-4% случаев аденокарцином легкого [Stephens *et al.*, 2004], а также в  $\leq 5\%$  карцином желудка, молочной железы и толстой кишки [Lee *et al.*, 2006]. Эти мутации вызывают изменение конформации киназного домена, повышая его сродство к АТФ, что в итоге приводит к усилению лиганднезависимой киназной активности [Herter-Sprue *et al.*, 2013].

В клетках аденокарцином легкого обнаружены аминокислотные замены в составе субдомена II внеклеточного домена HER2, нарушающие образование внутримолекулярных дисульфидных связей. Освободившиеся остатки цистеина замыкают межмолекулярные дисульфидные связи, вызывая

конститутивную гомодимеризацию и активацию киназы [Greulich *et al.*, 2012].

В карциномах молочной железы часто встречаются мутантные формы HER2 с обширной делецией внеклеточного домена, в совокупности обозначаемые p95HER2 [Arribas *et al.*, 2011]. Рассматривают два основных механизма образования фрагментов p95HER2: в результате протеолитического расщепления внеклеточными металлопротеиназами (шединга) с образованием 95-100 кДа фрагмента и в результате альтернативной трансляции мРНК HER2 с двух внутренних иницирующих кодонов, 611-го и 678-го, с образованием фрагментов 100-115 кДа и 90-95 кДа, соответственно. Фрагмент 90-95 кДа, лишенный трансмембранного домена и находящийся в цитоплазме, является неактивным. Из двух мембранных фрагментов наибольшей активностью обладает 100-115 кДа фрагмент. Обнаружено, что в его небольшом внеклеточном домене содержится несколько остатков цистеина, которые образуют межмолекулярные дисульфидные связи, обуславливая, таким образом, конститутивную гомодимеризацию и киназную активность [Arribas *et al.*, 2011]. Показана связь экспрессии этого укороченного фрагмента HER2 с высоким метастатическим потенциалом опухоли [Pedersen *et al.*, 2009].

Более часто встречающимся нарушением регуляции HER2 в опухолях является его гиперэкспрессия. В норме функция HER2 как природного усилителя пролиферативного сигнала строго контролируется – прежде всего, низким уровнем экспрессии соответствующего гена. Поскольку аффинность гетеродимеризации HER-HER2 сравнима с таковой гомодимеризации (по крайней мере, в случае HER1), при малом количестве молекул HER2 на поверхности клетки гетеродимеризация не является частым событием [Hendriks *et al.*, 2003]. Однако, в случае гиперэкспрессии рецептора HER2 не только повышается вероятность образования гетеродимерных комплексов в ответ на связывание лиганда, но и возможна спонтанная гомодимеризация

HER2, приводящая к постоянной лиганд-независимой активности HER2 [Yarden *et al.*, 2001]. Гиперэкспрессия HER2 может быть результатом как амплификации соответствующего гена, так и дисфункции факторов его транскрипции. Гиперэкспрессия HER2 наблюдается в карциномах молочной железы и яичника (20-30%) [Slamon *et al.*, 1989, Vermeij *et al.*, 2008], пищевода и желудка (15-20%) [Tanner *et al.*, 2005], простаты (25%) [Signoretti *et al.*, 2000] и ассоциируется с повышенным риском метастазирования и устойчивостью к химиотерапии [Harari *et al.*, 2000].

### 1.2.3 Таргетная терапия HER2-гиперэкспрессирующих опухолей

Высокий уровень экспрессии HER2, характерный для многих типов карцином, обуславливает значительные различия в количестве молекул рецептора на поверхности клеток опухолевой и нормальной тканей. Это, наряду с вовлеченностью HER2 в патогенез опухолей, открывает перспективы использования данного рецептора в качестве мишени для таргетной терапии.

В клинической практике нашли успешное применение две стратегии HER2-направленной терапии: воздействие на внеклеточный домен рецептора с помощью специфичных моноклональных антител и их производных и блокировка внутриклеточного киназного домена с помощью низкомолекулярных ингибиторов.

Первым таргетным агентом, одобренным для терапии HER2-положительной метастазирующей карциномы молочной железы (1998 г.), стал трастузумаб (Herceptin<sup>®</sup>) – гуманизированное моноклональное антитело, специфичное к IV субдомену внеклеточного домена рецептора [Carter *et al.*, 1992]. В настоящее время трастузумаб также используется в качестве адъювантной терапии при лечении прогрессирующих HER2-положительных карцином желудка и гастроэзофагеального перехода в комбинации с химиоагентами (цисплатином) [Yan *et al.*, 2014]. Предположительный

механизм действия трастузумаба включает активацию антителозависимой клеточной цитотоксичности, ингибирование протеолитического отщепления внеклеточного домена рецептора, а также блокировку опосредованных HER2 сигнальных путей – вероятно, как за счет индукции эндоцитоза рецептора с его последующей деградацией, так и посредством нарушения взаимодействия рецептора с киназами (в частности, Src), регулируемыми нижележащие пути передачи сигнала [Nagata *et al.*, 2004, Valabrega *et al.*, 2007].

Еще одно используемое в клинике HER2-специфичное моноклональное антитело – пертузумаб (Perjeta®). Пертузумаб связывается с субдоменом II внеклеточного домена HER2 и блокирует его лиганд-зависимую гетеродимеризацию с другими рецепторами семейства, тем самым нарушая передачу сигнала в клетку [Franklin *et al.*, 2004]. Пертузумаб одобрен для лечения HER2-положительных метастазирующих карцином молочной железы в сочетании с трастузумабом и доцетакселом, в том числе в качестве неоадьювантной терапии [Yan *et al.*, 2014].

Среди низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ для лечения HER2-экспрессирующих опухолей применяется лапатиниб (Tykerb®) – обратимый ингибитор рецепторов HER1 и HER2. Лапатиниб конкурирует с АТФ за сайт связывания киназного домена рецепторов. Его взаимодействие с рецепторами характеризуется медленной диссоциацией, что обеспечивает длительное ингибирование автофосфорилирования и дальнейшей трансдукции сигнала. В клинической практике используются комбинации лапатиниба с трастузумабом или капецитабином для лечения пациенток с HER2-положительными метастазирующими карциномами молочной железы, ранее получавших трастузумаб [Segovia-Mendoza *et al.*, 2015].

Несмотря на достаточно широкое применение перечисленных HER2-специфичных препаратов, более успешное при их комбинированном действии и сочетании с химиоагентами, серьезной проблемой остается их

недостаточная эффективность. Важную роль здесь играет приобретаемая в процессе лечения резистентность к ним опухолевых клеток. Механизмы возникновения резистентности весьма разнообразны и отражают, с одной стороны, разветвленность сложной системы HER2-опосредованной сигнальной трансдукции с возможностью активирования альтернативных путей передачи сигнала, а с другой – высокую генетическую изменчивость опухолевых клеток.

Так, развитие устойчивости к трастузумабу может быть следствием мутаций или изменения транскрипционной активности генов белковых участников HER2-опосредованных сигнальных путей, что приводит к усилению передачи сигнала (например, снижение уровня экспрессии гена фосфатазы PTEN, регулирующей фосфорилирование белков сигнального пути PI3K/Akt, а также активирующая мутация или гиперэкспрессия киназы PI3K). Кроме этого, в ответ на блокировку HER2 трастузумабом могут активироваться обходные сигнальные пути, запускаемые другими рецепторными тирозинкиназами (рецептором инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1R), рецептором фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) и др.) [Fizman *et al.*, 2011]. Приобретаемая устойчивость к лапатинибу, помимо запуска обходных сигнальных каскадов, часто связана с мутацией в киназном домене HER2, повышающей аффинность взаимодействия с АТФ, что снижает эффективность конкурентного связывания с ингибитором [Herter-Sprue *et al.*, 2013].

Перспективной стратегией, направленной на увеличение специфического токсического действия на опухолевые клетки, является создание на основе антител бифункциональных конструкций, содержащих мощный токсический компонент [Weiner, 2015]. В таких конструкциях антитело выполняет адресную функцию, обеспечивая направленную доставку конъюгата к опухолевым клеткам. Широкое распространение получила разработка химических конъюгатов полноразмерных антител с

низкомолекулярными токсическими веществами (*англ.* ADC – Antibody-Drug Conjugate). Созданный в рамках этого подхода химический конъюгат трастузумаба с ингибитором сборки микротрубочек класса майтанзиноидов, трастузумаб эмтанзин (Kadcyla<sup>®</sup>), успешно прошел клинические испытания и был недавно одобрен для монотерапии метастатического рака молочной железы у пациенток, для которых предыдущая терапия трастузумабом и таксаном не дала результата [**Lambert et al., 2014**].

Получение ADC как химических конъюгатов представляет собой весьма сложную задачу. Одну из основных проблем представляет гетерогенность конъюгатов, получаемых стандартными методами amino- или цистеин-специфичной конъюгации, что приводит к смеси продуктов с различающимися свойствами (в частности, различными сайтами конъюгации и различным количеством молекул токсина на молекулу антитела). Для решения этой проблемы были разработаны методы сайт-направленной конъюгации, предполагающие введение в молекулу антитела новых остатков цистеина или селеноцистеина. Подобные модификации могут привести к агрегации антител или их неправильному фолдингу и инактивации, поэтому требуют тщательного предварительного анализа возможных сайтов аминокислотных замен. Не менее важным аспектом является подбор линкера, соединяющего токсический агент с антителом, который должен обеспечивать, с одной стороны, стабильность конъюгата в кровотоке, а с другой – высвобождение токсического агента в опухоли [**Panowksi et al., 2014**]. Наконец, необходимым шагом является очистка конъюгатов от несвязавшегося агента, а также итоговый физико-химический анализ качества полученных ADC (оценка количества «загруженного» действующего вещества, контроль агрегации конъюгатов и стабильности линкера и т. п.). Эти задачи требуют использования ряда высокотехнологичных методов, таких как масс-спектрометрия, иммуноферментный анализ, различные виды хроматографии, причем набор

подходящих методов определяется особенностями конъюгируемого агента, линкера и сайта конъюгации [Wakankar *et al.*, 2011]. Таким образом, получение ADC представляет собой трудоемкий, технически сложный и дорогостоящий процесс.

Альтернативным подходом является получение бифункциональных рекомбинантных белков – иммунотоксинов. В этом случае в качестве эффекторного вещества используются токсины белковой природы.

### **1.3 Иммунотоксины как агенты для таргетной противоопухолевой терапии**

#### **1.3.1 Общая структура и эволюция иммунотоксинов**

Иммунотоксины представляют собой белковые молекулы, состоящие из двух функциональных модулей: токсического (эффекторного) и направляющего, обеспечивающего нацеленную доставку к опухолевым клеткам [Kreitman, 2006]. В качестве направляющего модуля используются моноклональные антитела и их фрагменты, а также другие молекулы, обладающие сродством к поверхностным мишеням. В последнее время в качестве нацеливающих молекул широкое распространение также получили альтернативные каркасные белки – дарпины, аффибоды, аптамеры и др. Эффекторный модуль иммунотоксина может быть представлен белковым токсином бактерий, растений, грибов или животных [Frankel *et al.*, 2009].

Иммунотоксины первого поколения представляли собой химические конъюгаты моноклонального антитела и полноразмерного токсина [Andersson *et al.*, 2004, Engebraaten *et al.*, 2000]. Однако, такие соединения обнаруживали высокую системную токсичность в силу неспецифического взаимодействия собственного связывающего домена токсина с нормальными клетками. В связи с этим, в иммунотоксинах следующего поколения антитело было конъюгировано с укороченным фрагментом токсина, лишенным природной специфичности. По причине гетерогенности

химических конъюгатов и сложности их производства в дальнейшем широкое распространение получили генно-инженерные технологии создания рекомбинантных иммунотоксинов – белков слияния укороченного токсина с фрагментом антитела [Deyev *et al.*, 2009, Shapira *et al.*, 2010]. Преимуществами таких рекомбинантных иммунотоксинов являются также сохранение функциональных свойств модулей и улучшенная фармакокинетика за счет меньшего размера.

### 1.3.2 Направляющий модуль рекомбинантных иммунотоксинов

#### *Направляющий модуль на основе антител*

Значительные успехи, достигнутые в лечении онкологических заболеваний гуманизированными моноклональными антителами, обусловили их первоначально широкую популярность в качестве направляющих модулей в составе иммунотоксинов. Однако, большой размер молекулы, сложность производства, а также наличие эффекторных функций, обусловленных константными доменами, затрудняли их применение для направленной доставки цитотоксических агентов.

С развитием методов генной инженерии подходы к разработке иммунотоксинов перешли на новый уровень. Стало возможным получение рекомбинантных фрагментов антител и адресных модулей на основе этих фрагментов. Первым таким модулем стало антитело формата scFv (*англ.*, single-chain fragment variable) – одноцепочечный (кодируемый одним геном) модуль, представляющий собой переменные домены легкой ( $V_L$ ) и тяжелой ( $V_H$ ) цепей иммуноглобулина, соединенные гибким пептидным линкером (25-30 кДа) [Bird *et al.*, 1988, Huston *et al.*, 1988]. Почти сразу же появился первый генетически-кодируемый (рекомбинантный) иммунотоксин, содержащий антитело формата scFv [Chaudhary *et al.*, 1989].

Близким к scFv является формат dsFv (*англ.*, disulfide-stabilized fragment variable), в составе которого  $V_H$  и  $V_L$  соединены дисульфидной связью.

Антитело dsFv характеризуется большей термостабильностью [**Brinkmann et al., 1993, Reiter et al., 1996**].

Еще более компактными (15 кДа) направляющими молекулами служат нанободи – переменные домены тяжелых цепей неканонических антител, обнаруженных у хрящевых рыб и некоторых млекопитающих (верблюды, лама), отличающиеся высокой стабильностью [**Greenberg et al., 1995, Hamers-Casterman et al., 1993**]. Нанободи нашли широкое применение в различных областях биомедицины и биотехнологии [**Hassanzadeh-Ghassabeh et al., 2013**], в том числе в качестве адресной молекулы в составе рекомбинантных иммунотоксинов [**Behdani et al., 2013**].

Основным преимуществом рекомбинантных иммунотоксинов, конструируемых на основе перечисленных направляющих модулей, является их относительно небольшой размер (около 60 кДа), обеспечивающий лучшее проникновение и накопление в опухолевой ткани. С другой стороны, моновалентного связывания таких модулей с мишенью иногда бывает недостаточно для прочного (длительного) удержания агента на поверхностных рецепторах-мишенях, что снижает эффективность его накопления в опухоли. В целях повышения avidности направляющего модуля были разработаны подходы к мультимеризации антител (диабоды, триабоды и др.) [**Nelson, 2010, Thompson et al., 2001**]. Агенты с мультимерными направляющими модулями характеризуются улучшенной фармакокинетикой также за счет несколько более длительной циркуляции в кровотоке [**Shan et al., 2013**].

#### ***Направляющий модуль на основе альтернативных каркасных белков***

В последнее десятилетие получили распространение разнообразные связывающие молекулы (скаффолды) неиммуноглобулиновой природы, в совокупности называемые альтернативными каркасными белками (АКБ). АКБ представляют собой модифицированные природные белки или их

фрагменты, структурной основой которых является жесткий консервативный белковый каркас, на поверхности которого экспонирована гипервариабельная область, обеспечивающая узнавание и связывание мишени [Ruigrok *et al.*, 2011, Skerra, 2007].

Среди АКБ для нацеливания токсического компонента на опухоль используются, например, дарпины (анкириновые повторы), антикалины (производные липокалинов), аффибоди (Z-домен антителосвязывающего бактериального протеина A) [Martin-Killias *et al.*, 2011, Proshkina *et al.*, 2015, Schlehuber *et al.*, 2005, Zielinski *et al.*, 2011].

Все эти белки имеют природную функцию специфического связывания с лигандом, обеспечивающую белок-белковые взаимодействия, транспорт веществ и др. С помощью конструирования комбинаторных библиотек с последующей селекцией высокоаффинных вариантов методом фагового дисплея можно создать АКБ с требуемыми специфичностью и аффинностью. Конкурентными преимуществами АКБ являются малые размеры (10-20 кДа), высокая стабильность в широком диапазоне условий и отсутствие остатков цистеина, что обеспечивает высокий выход наработки функционально активных мономеров белка в бактериальных продуцентах [Binz *et al.*, 2005].

Таким образом, направляющий модуль в составе рекомбинантного иммунотоксина должен удовлетворять следующим требованиям:

- 1) эффективное (аффинное и селективное) связывание с мишенью;
- 2) небольшой размер;
- 3) стабильность в физиологических условиях;
- 4) отсутствие взаимодействия с компонентами иммунной системы.

### 1.3.3 Токсический модуль рекомбинантных иммунотоксинов

#### *Разнообразие природных белковых токсинов*

В качестве токсического модуля иммунотоксинов используется большое число природных белковых токсинов различного происхождения, которые можно условно разделить на несколько групп в соответствии с механизмом их токсичности [Frankel *et al.*, 2009].

Токсины *первой группы* представляют собой ферменты, нарушающие метаболические процессы непосредственно внутри клетки-мишени. Многие из таких белков имеют природный сложный механизм внутриклеточного транспорта.

Растительные токсины, относящиеся к этой группе, носят название белков-ингибиторов рибосом (*англ.*, Ribosome-Inactivating Protein, RIP). Среди них выделяют холотоксины (рицин, лектин, абрин) и хемитоксины (сапорин, гелонин). Холотоксины представляют собой гетеродимеры с молекулярным весом около 60 кДа, состоящие из связывающего и каталитического доменов, соединенных дисульфидной связью. Связывающий домен обеспечивает взаимодействие токсина с гликопротеинами на поверхности животной клетки с последующей его интернализацией. Каталитический домен представляет собой N-гликозидазу, отщепляющую от 28S рибосомальной РНК остаток аденина, обеспечивающий ее взаимодействие с эукариотическими факторами элонгации трансляции eEF1 и 2 (*англ.*, eukaryotic elongation factor). Это нарушает связывание факторов элонгации трансляции с 60S-субъединицей рибосомы и блокирует биосинтез белка. Хемитоксины (25-31 кДа) содержат только каталитический домен, который по своей аминокислотной последовательности, пространственной структуре и ферментативной активности аналогичен каталитическому домену холотоксинов [Kreitman, 2006].

К бактериальным токсинам первой группы относятся, в частности, псевдомонадный экзотоксин А (*англ.*, Pseudomonas exotoxin, PE) и дифтерийный токсин (*англ.*, Diphtheria toxin, DT). Несмотря на различия в первичной структуре и природной специфичности, оба токсина катализируют АДФ-рибозилирование eEF2, что вызывает его необратимую инактивацию. Пространственная организация DT и PE также аналогична: эти белки представляют собой единую полипептидную цепь массой около 60 кДа, образующую три домена – связывающий, транслокационный и каталитический. Однако, пути внутриклеточного транспорта DT и PE, обеспечивающие выход каталитического домена в цитоплазму, принципиально различаются. Для DT характерен прямой выход в цитоплазму из ранних эндосом сразу после эндоцитоза, в то время как PE проходит более многостадийный путь, используя механизмы ретроградного белкового транспорта в клетке [Kreitman, 2006].

К первой группе токсинов, используемых для создания иммунотоксинов, относятся также некоторые представители рибонуклеаз позвоночных и бактерий. Рибонуклеазы (РНКаза) представляют собой небольшие белки массой 14-16 кДа, осуществляющие гидролиз РНК, что приводит к остановке синтеза белка в клетке-мишени и ее апоптозу. Привлекательность РНКаза в значительной степени обусловлена отсутствием токсического эффекта вне клетки, то есть отсутствием необходимости модификаций белка для снижения системной токсичности. Использование РНКаза человеческого происхождения (РНКаза эозинофилов, панкреатическая РНКаза) также снимает проблему иммуногенности, но, с другой стороны, их эффективность лимитирована действием цитоплазматического ингибитора РНКаза, что требует создания устойчивых мутантных форм [Weidle *et al.*, 2012]. Альтернативу представляет бактериальная РНКаза барназа, устойчивая к данному ингибитору [Deyev *et al.*, 2009].

В рамках поиска пути преодоления иммуногенности, характерной для иммунотоксинов на основе чужеродных белковых токсинов, было предложено использовать и другие ферменты человеческого происхождения, помимо РНКаз. Среди них, в частности, проапоптотические белки семейства Bcl-2 и протеаза гранзим В, синтезируемая НК-клетками и Т-киллерами [Mathew *et al.*, 2009, Weidle *et al.*, 2012]. Однако, стоит отметить, что изначально подобные белки в своей эндогенной форме не способны к выходу из эндосом, что является причиной низкой цитотоксичности иммунотоксинов на их основе, попадающих в клетку извне путем эндоцитоза. Для преодоления этой проблемы встает необходимость параллельного воздействия эндосомолитическими веществами (например, хлорокином). Также были предприняты более или менее успешные попытки включения в рекомбинантные иммунотоксины на основе таких белков транслокационного домена бактериальных токсинов [Mahmud *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010, Yu *et al.*, 2006].

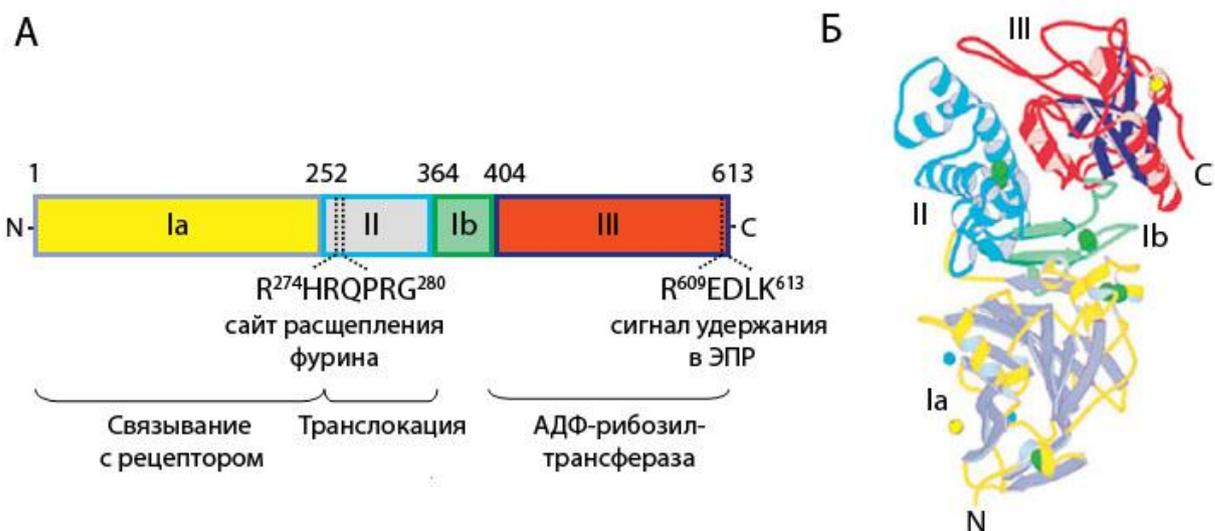
Механизм действия токсинов *второй группы* обусловлен их связыванием с поверхностью клетки и запуском внутриклеточных сигнальных путей, которые вызывают клеточную гибель. Представителем данной группы является  $\alpha$ -токсин из бациллы *Clostridia perfringens*, каталитический домен которого представлен фосфолипазой С. Гидролиз фосфатидилхолина мембраны под его действием приводит к активации каскада арахидоновой кислоты и протеинкиназы С, влекущей клеточную смерть [Chovnick *et al.*, 1991, Frankel *et al.*, 2009].

Токсины *третьей группы* способны встраиваться в мембрану и образовывать в ней поры, вызывая гибель клетки путем осмотического шока. К данной группе относится, например, стихолизин из актинии *Stoichactis helianthus*, входящий в семейство актинопоринов [Frankel *et al.*, 2009, Tejuca *et al.*, 2004].

Несмотря на разнообразие вариантов белковых молекул различного происхождения для использования в качестве токсического модуля в составе иммунотоксина, не все они нашли широкое применение. Богатый опыт разработки агентов направленного действия на основе различных токсинов позволил выявить основные критерии выбора токсического модуля иммунотоксина: (1) высокая токсичность, (2) доменная структура с функциональной обособленностью отдельных доменов, (3) наличие природного механизма попадания в клетку извне и внутриклеточного транспорта, (4) возможность генно-инженерных модификация без существенного влияния на механизм цитотоксичности. Перечисленным требованиям полностью отвечает псевдомонадный экзотоксин А.

### ***Структура и механизм действия PE***

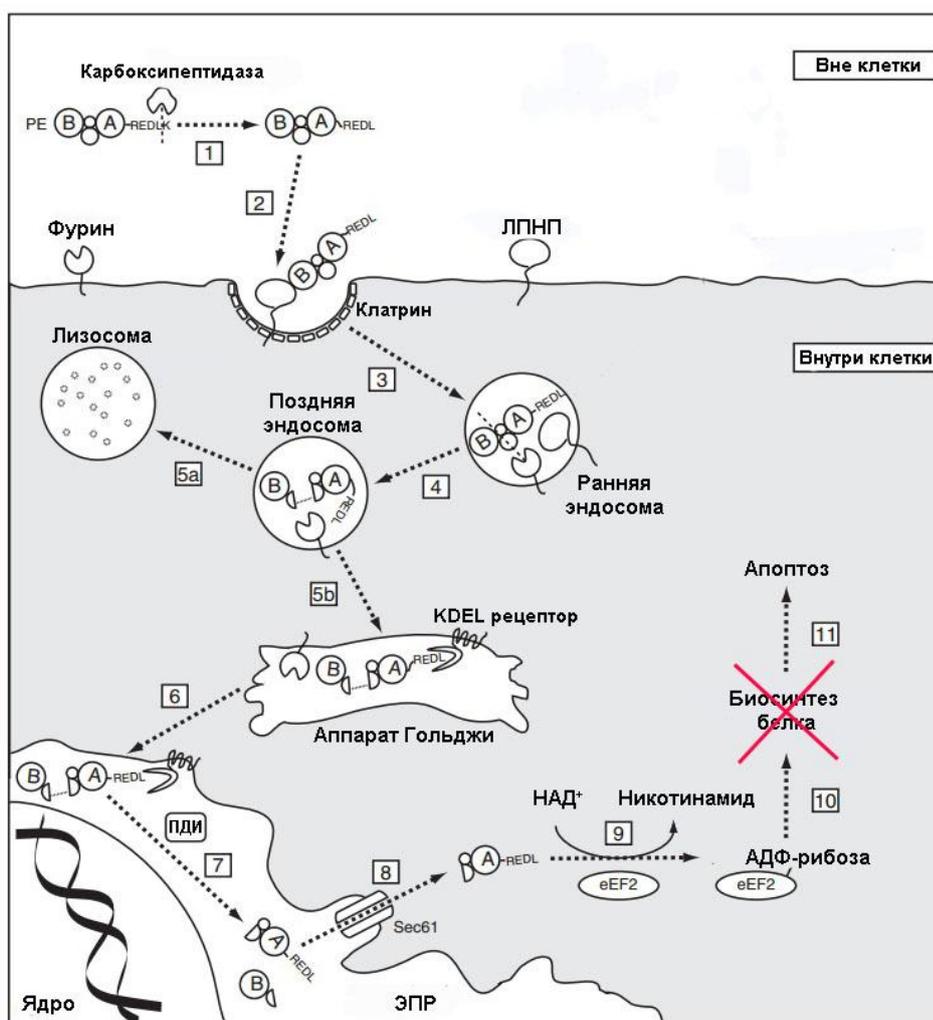
Псевдомонадный экзотоксин А (PE) – высокотоксичный мономерный белок ( $LD_{50} \approx 200$  нг/кг) массой 66 кДа, секретируемый грамм-отрицательной бактерией *Pseudomonas aeruginosa*. В структуре PE выделяют три домена (рис. 6): домен Ia специфически связывается с  $\alpha 2$ -макроглобулиновым рецептором на поверхности животной клетки, домен II участвует во внутриклеточном транспорте токсина, домен III (каталитический) инактивирует eEF2 путем АДФ-рибозилирования остатка дифтамида в его составе, что приводит к нарушению взаимодействия eEF2 с большой субъединицей рибосомы и блокировке биосинтеза белка в клетке. Функция домена Ib до конца не выяснена, вероятно, он способствует каталитической активности домена III [Hwang *et al.*, 1987, Kreitman, 2006].



**Рисунок 6.** Псевдомонадный экзотоксин А. Представлены: схема полипептидной цепи с указанием доменов Ia, II, Ib, III (А) и трехмерная структура белковой глобулы (ленточная диаграмма) (Б) (адаптировано из [Wolf *et al.*, 2009]).

После связывания с рецептором и рецептор-опосредованного эндоцитоза PE проходит в клетке многостадийный транспортный путь, предваряющий выход его каталитического домена в цитоплазму (рис. 7) [Weldon *et al.*, 2011].

Первым необходимым событием является расщепление PE трансмембранной протеазой фурином по сайту, расположенному в домене II (см. рис. 6), с образованием N-концевого (28 кДа) и С-концевого (37 кДа) фрагментов. Клетки, мутантные по фурину, демонстрируют устойчивость к PE [Inocencio *et al.*, 1994]. После протеолиза образовавшиеся фрагменты остаются соединенными ковалентной связью, образованной парой цистеинов домена II (C265-C287). Восстановление этой дисульфидной связи – следующий шаг, необходимый для эффективного процессинга PE. Предполагается, что в этой реакции участвуют протеиновые дисульфидизомеразы, которые в большом количестве находятся во многих компартментах клетки [McKee *et al.*, 1999].



**Рисунок 7.** Механизм внутриклеточного транспорта PE (адаптировано из [Weldon *et al.*, 2011]). Фрагменты PE обозначены буквами «А» (С-концевой, 37 кДа) и «В» (N-концевой, 28 кДа). Цифрами обозначены основные стадии транспорта: отщепление С-концевого остатка лизина карбоксипептидазой (1); связывание фрагмента В с  $\alpha 2$ -макроглобулиновым рецептором (ЛПНП, 2); рецептор-опосредованный клатрин-зависимый эндоцитоз (3); расщепление PE протеазой фурином по сайту в домене II с образованием фрагментов А и В (4); возможная деградация в лизосомах (5a); продуктивный транспорт в аппарат Гольджи (5b); взаимодействие с рецептором KDEL и ретроградный транспорт в ЭПР (6); восстановление дисульфидной связи между фрагментами А и В протеиновыми дисульфидизомеразами (ПДИ, 7); транслокация фрагмента А в цитоплазму через транслокон Sec61 (8); АДФ-рибозилирование eEF2 фрагментом А токсина (9); остановка биосинтеза белка (10); гибель клетки путем апоптоза (11).

Накопленный экспериментальный материал свидетельствует о том, что PE дикого типа транспортируется в ЭПР. На С-конце PE была обнаружена последовательность REDL (арг-глю-асп-лей) (см. рис. 6) [Chaudhary *et al.*,

1990], представляющая собой аналог последовательности KDEL (лиз-асп-глу-лей) – хорошо известного сигнала удержания белка в ЭПР. Белки, содержащие такие последовательности, узнаются KDEL-рецептором мембраны аппарата Гольджи. Этот механизм лежит в основе ретроградного транспорта белков в клетке: KDEL-рецептор циркулирует между мембранами аппарата Гольджи и ЭПР, обеспечивая возвращение в ЭПР белков-резидентов [Munro *et al.*, 1987]. Было экспериментально подтверждено, что PE транспортируется из аппарата Гольджи в ЭПР посредством этого механизма, и что этот процесс является критическим для проявления цитотоксического эффекта PE [Chaudhary *et al.*, 1990, Jackson *et al.*, 1999].

Процесс выхода PE из ЭПР в цитоплазму остается наименее изученным. Предполагается взаимодействие PE с белковым комплексом мембраны ЭПР, образующим водный канал – транслоконом Sec61p [Hazes *et al.*, 1997]. Этот транслокон, как предполагают, служит для переноса белков через мембрану в обоих направлениях – как в случае перемещения вновь синтезированных секретируемых белков из цитоплазмы в люмен, так и в случае обратной транслокации (ретротранслокации) неправильно свернутых белков в цитоплазму для протеасомальной деградации. Механизм ретроградной транслокации известен под названием ЭПР-опосредованной деградации (*англ.*, ER-associated degradation, ERAD) [Льюин, 2011]. Однако, остается неясным, что является сигналом для транспорта PE путем ERAD. Интересно, что C-концевой фрагмент PE, который должен оказаться в цитоплазме для выполнения своей функции, является дефицитным по лизину (2 остатка, по сравнению с 15-ю остатками в N-концевом фрагменте) [London *et al.*, 1989]. Это снижает эффективность его убиквитинилирования, таким образом, являясь механизмом защиты от деградации. Оказавшись в цитоплазме, C-концевой фрагмент PE катализирует реакцию переноса АДФ-рибозила с НАД<sup>+</sup> на высококонсервативный остаток дифтамида eEF2, нарушая

взаимодействие eEF2 с рибосомой и ингибируя элонгацию трансляции [Weldon *et al.*, 2011].

Стоит отметить, что, в отличие от четко установленных функций доменов I и III PE, функции домена II, помимо линкерной, остаются не выясненными. Удаление большей его части (за исключением сайта расщепления фурина) может как ослаблять, так и усиливать цитотоксичность PE, что, по всей видимости, зависит от биологии используемых клеток.

На сегодняшний день общепринятым механизмом клеточной смерти под действием PE является апоптоз. Стоит отметить, что большинство исследований, посвященных изучению молекулярных механизмов запуска апоптоза под действием PE, проводится с использованием иммунотоксинов на его основе, в то время как доля исследований эффекта дикого токсина мала. Так, в ряде работ продемонстрировано появление морфологических признаков апоптоза (фрагментация ядер), а также активация каспаз под действием PE или иммунотоксинов на основе PE [Jenkins *et al.*, 2004, Kawakami *et al.*, 2003, Keppler-Hafkemeyer *et al.*, 1998, Keppler-Hafkemeyer *et al.*, 2000, Kochi *et al.*, 1993, Komatsu *et al.*, 1998, Sharma *et al.*, 2010]. На основании анализа активации каспаз сообщалось также о запуске апоптоза как по внутреннему митохондриальному (опосредованному каспазой 9), так и по внешнему рецепторному (опосредованному каспазой 8) путям [Kawakami *et al.*, 2003].

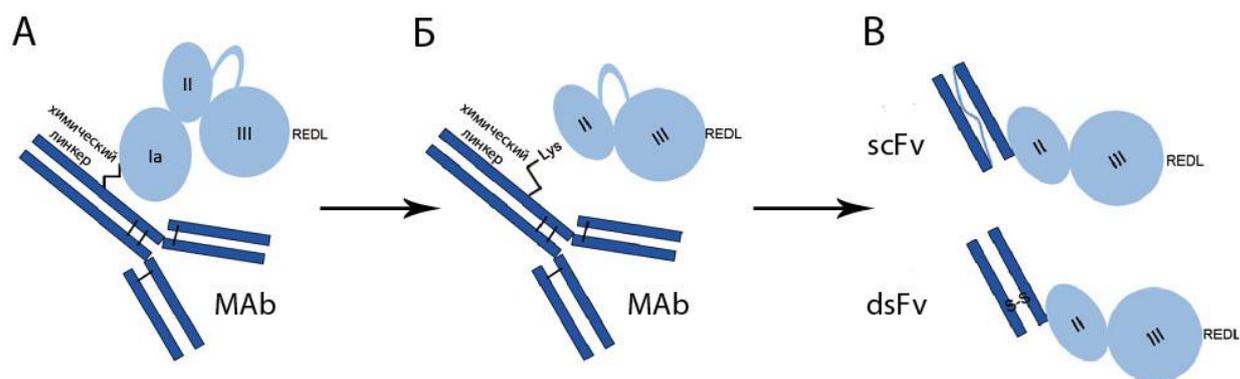
Однако, взаимосвязь ингибирования биосинтеза белка и запуска апоптоза остается предметом исследований. В работах [Keppler-Hafkemeyer *et al.*, 1998, Keppler-Hafkemeyer *et al.*, 2000] эти два процесса показаны как самостоятельные механизмы, приводящие к гибели клетки под действием иммунотоксинов на основе PE. С другой стороны, в ряде исследований установлена прямая причинно-следственная связь между этими процессами; при этом доказано, что в результате ингибирования синтеза белка под действием PE нарушается соотношение белков-антагонистов семейства Bcl-

2, проапоптотического белка Bax и короткоживущего антиапоптотического белка Mcl-1, что запускает механизм апоптоза в фибробластах [Du *et al.*, 2010] и клетках карциномы молочной железы MA-11 [Andersson *et al.*, 2004]. Сообщалось также о влиянии уровня экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках карциномы молочной железы MCF-7 и лимфомы разных линий на эффективность апоптоза под действием иммунотоксинов на основе PE [Bogner *et al.*, 2010, Brinkmann *et al.*, 1997]. Вероятно, белки-регуляторы апоптоза могут вносить различный вклад в процессы, вызываемые ингибированием биосинтеза белка, в зависимости от молекулярного профиля конкретных клеток.

### ***Рекомбинантные иммунотоксины на основе PE***

Стратегия получения иммунотоксинов на основе PE совершенствовалась в процессе изучения строения и функциональной активности токсина, а также с развитием инженерии антител (рис. 8). Известно несколько иммунотоксинов, в составе которых с полноразмерным моноклональным антителом был соединен токсин дикого типа [Andersson *et al.*, 2004, Bjorn *et al.*, 1990, Debinski *et al.*, 1992, Engebraaten *et al.*, 2000, Pai *et al.*, 1991] (рис. 8А), а затем укороченный токсин, лишенный собственного связывающего домена [Debinski *et al.*, 1992, Essand *et al.*, 1998, Wolf *et al.*, 2009] (рис. 8Б). Иммунотоксины последнего поколения представляют собой рекомбинантные белки с направляющими модулями на основе фрагментов антител – scFv или dcFv (рис. 8В).

Усовершенствование формата иммунотоксинов решило сразу несколько проблем. Во-первых, элиминирование природного рецептор-узнающего (I) домена PE значительно уменьшило как неспецифическую токсичность получаемых агентов (то есть снизило риск возможных побочных эффектов), так и иммуногенность токсина.



**Рисунок 8.** Развитие стратегии создания иммунотоксина на основе РЕ в качестве токсического модуля. Представлены: полноразмерное МАб, химически конъюгированное с токсином дикого типа (А) или с фрагментом токсина, лишенным связывающего (I) домена (Б), и рекомбинантные иммунотоксины – белки слияния фрагмента токсина с модулем на основе фрагментов антитела (scFv, dsFv) (В) (адаптировано из [Antignani *et al.*, 2013]).

Во-вторых, уменьшение итогового размера молекулы иммунотоксина оптимизировало его фармакокинетику за счет лучшего проникновения в опухолевую ткань. В-третьих, наработка рекомбинантных иммунотоксинов в бактериальных продуцентах позволила получать гомогенный, функционально-активный продукт в больших количествах [Antignani *et al.*, 2013, Shan *et al.*, 2013].

Иммуногенность белков бактериального происхождения представляет довольно серьезную проблему при клиническом применении иммунотоксинов [Mazor *et al.*, 2016]. Введение РЕ дикого типа вызывает образование нейтрализующих антител, которые блокируют токсин при повторных инъекциях, делая невозможным курсовое лечение. Применение укороченного фрагмента, лишенного домена I (РЕ40), значительно снижает иммунный ответ, но, как правило, недостаточно. Особенно остро эта проблема стоит при терапии пациентов с солидными опухолями, иммунная система которых функционирует нормально. В связи с этим, предпринимаются дальнейшие попытки снизить иммуногенность РЕ. Одним из известных подходов является ПЭГилирование (соединение с ПЭГ –

полиэтиленгликолем), однако, в случае иммунотоксинов на основе PE заключение в ПЭГ значительно снижало их токсичность [Benhar *et al.*, 1994]. Более успешным оказался вариант предварительного и параллельного введения пациентам иммуносупрессоров (пентостатина, циклофосфамида). Наконец, самым эффективным методом снижения иммуногенности PE стала прицельная модификация его первичной последовательности: была проведена серия работ по выявлению и элиминации эпитопов В- и Т-лимфоцитов в составе PE [Mazor *et al.*, 2012, Onda *et al.*, 2011, Onda *et al.*, 2006]. Стоит особенно подчеркнуть, что проведенные в рамках данного подхода многочисленные замены поверхностных гидрофильных аминокислотных остатков на нейтральные (аланин) не повлияли на токсические свойства белка.

Таким образом, PE представляет большие перспективы при использовании в качестве токсического модуля рекомбинантных иммунотоксинов. Однако, несмотря на то, что на сегодняшний день создано большое количество таких агентов различной специфичности, клинические испытания проходит лишь небольшая группа препаратов (табл. 3). В связи с этим, актуальной задачей представляется получение и исследование свойств новых рекомбинантных иммунотоксинов, специфичных к ряду других клинически-значимых мишеней – в частности, к онкомаркеру HER2.

Таблица 3.

Рекомбинантные иммунотоксины на основе PE, проходящие клинические испытания (по данным [Alewine *et al.*, 2015])

Иммунотоксин	Мишень	Категория пациентов	Стадия клинических исследований
Moxetumomab pasudotox	CD22	Волосатоклеточный лейкоз	III
		Острый лимфобластный лейкоз взрослых	I/II
		Острый лимфобластный лейкоз детей	I
LMB-2	CD25	Волосатоклеточный лейкоз	II
		T-клеточный лейкоз взрослых	II
SS1P	Мезотелин	Мезотелиома	II
MOС31PE	ЕрСАМ	Эпителиальные карциномы	I
Opportuzumab monatox	ЕрСАМ	Преинвазивная карцинома мочевого пузыря	нет данных

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Оборудование и материалы

#### *Оборудование*

Хроматографическая система АКТА Pure 25 M1 (GE Healthcare); оптический биосенсор BIAcore 3000 (GE Healthcare); инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 200 (Carl Zeiss); системы лазерной сканирующей микроскопии Axiovert 200M LSM 510 META NLO, Axio Observer Z1 LSM 710 DUO NLO (Carl Zeiss); установка для поверхностного флуоресцентного имиджинга (Институт прикладной физики РАН, г. Н. Новгород); планшетный спектрофотометр Synergy Mx (BioTek); проточный цитофлуориметр FACS Calibur и проточный цитофлуориметр-сортер FACS Aria III (BD Biosciences); настольные центрифуги 5810R, 5418R, Minispin (Eppendorf), Z36HK (Hermle Labortechnik GmbH); центрифуга-вортекс Microspin FV-2400 (Biosan); орбитальный шейкер Mini-Shaker PSU-2T (Biosan); программируемый ротатор-миксер Multi Bio RS-24 (Biosan); горизонтальный шейкер-термостат Innova40 (New Brunswick Scientific Inc.); денситометр DEN-1 (Biosan); суховоздушный термостат и сухожаровой шкаф (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ); CO<sub>2</sub>-инкубатор MC0175 (Sanyo); водяная баня WB-4MS (Biosan); магнитная мешалка MSH-300 (Biosan); весы аналитические Adventurer Pro (Ohaus); деионизатор воды Simplicity (Millipore); ламинарно-поточный шкаф I класса биологической безопасности (Kojair); ламинарно-поточный шкаф II класса биологической безопасности (NuAire); ламинарно-поточный шкаф I класса биологической безопасности для содержания иммунодефицитных лабораторных мышей (Labconco); ультразвуковой дезинтегратор Labsonic P (Sartorius); вакуумный насос WP6211560 (Millipore); программируемый твердотельный термостат Гном (ДНК-Технология); камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN

(BioRad); система для полусухого переноса Trans-Blot SD (BioRad); источник питания Эльф-4 (ДНК-Технология); стерилизатор паровой (автоклав) ВК-75 (ОАО "Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов"); рН-метр рН-150М (РУП «Гомельский завод измерительных приборов»); холодильники специальные и бытовые, поддерживающие температуру +4, –20, –70 и –135 °С; одноканальные механические дозаторы Transferpette S переменного объема (Brand); камера Горяева (МиниМед); хроматографические колонки HisTrap FF 1 ml, Superdex 200 10/300 GL, PD MiniTrap G-25, PD MidiTrap G-25, PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare); центрифужные фильтрующие устройства Amicon Ultra (Millipore); фильтрующие насадки и мембраны с размером пор 0,22 и 0,45 мкм (Millipore); поливинилиденфторидная (PVDF) мембрана для переноса Immobilon-P (Millipore); центрифужные пробирки Falcon на 15 и 50 мл (BD Biosciences); центрифужные микропробирки типа Eppendorf на 0,5, 1,5 и 2 мл (Greiner); пробирки для проточного цитофлуориметра (BD Biosciences); наконечники для автоматических пипеток (Greiner); культуральные и микробиологические чашки Петри; адгезивные культуральные флаконы и планшеты (Corning); стеклянные шпатели; стерильные одноразовые шприцы; инструментарий для работы с лабораторными животными (поликарбонатные клетки с поилками, ветеринарные хирургические пинцеты, остроконечные прямые ножницы, пластиковые биопсийные кассеты).

### *Реактивы*

Реактивы отечественного производства (категории «хч» и «осч»): этанол, метанол, изопропанол, соляная кислота, уксусная кислота, борная кислота, хлорид кальция, хлорид натрия, гидроксид натрия, гидроортофосфат калия, дигидроортофосфат калия, глицин, L-глутамин, трипсин, фосфатно-солевой буфер в таблетках (PBS), раствор Версена, ампициллин, канамицина сульфат, пенициллин-стрептомицин, диметилсульфоксид (DMSO), глицерин,

глюкоза, трис-(гидроксиметил)-аминометан, азид натрия, бромфеноловый синий, додецилсульфат натрия (SDS).

Реактивы зарубежного производства: хлорид магния (Panreac), хлорид никеля (Panreac), твин-20 (Merck Millipore), кумасси G-250 (Dudley Chemical), тетраборат натрия (Panreac), формальдегид (Applichem Panreac), имидазол (AppliChem), β-меркаптоэтанол (AppliChem), ЭДТА-Na<sub>2</sub> (Panreac), тритон X-100 (Panreac), акриламид (AppliChem), N,N'-метилен-бисакриламид (Acros), APS (Applichem), TEMED (AppliChem), обезжиренное сухое молоко (AppliChem), ТМВ (Promega), МТТ (Alfa Aesar), генетицин (Sigma), BSA (Sigma), агар (Kevico International Ltd), триптон (Panreac), дрожжевой экстракт (Helicon), ИПТГ (Sigma), лизирующий буфер В-PER (Promega), иммерсионное масло (Carl Zeiss), хлорпромазина гидрохлорид (Sigma), филиппин (Sigma), PMSF (AppliChem), рекомбинантный внеклеточный домен рецептора HER2 – p185 HER2 ECD (Sino Biological), эмбриональная сыворотка теленка (HyClone); питательная среда McCoy's 5A (HyClone), питательная среда RPMI1640, не содержащая метионина (Gibco Life Technologies), питательная среда DMEM (ПанЭко), окрашенный и неокрашенный маркеры молекулярных масс для электрофореза белков PageRuler (Thermo Fisher Scientific), ростовой субстрат Matrigel (BD Biosciences), реактив для трансфекции Unifectin56 (Unifect Group).

Антитела: мышинные моноклональные анти-гистидиновые антитела (Thermo Fisher Scientific); козы анти-мышинные поликлональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (BD Pharmingen); мышинные моноклональные анти-HER2 антитела (R&D Systems).

Флуоресцентные красители: FITC (Thermo Fisher Scientific), DyLight650 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific), LysoTracker Green, Bodipy FL C5-ceramide, ER-Tracker Green (Thermo Fisher Scientific), Hoechst 33258, DAPI (Sigma).

Наборы: BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), Protease Inhibitor

Cocktail EDTA-Free (Thermo Fisher Scientific), Click-iT® AHA Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis HCS Assay (Invitrogen), FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen), Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit (BD Biosciences).

Плазмида pTurboFP635-N, содержащая ген флуоресцентного белка TurboFP635 (Katushka) (Евроген).

### *Растворы и среды*

#### Растворы для трансформации E. Coli

TB1	50 мМ CaCl <sub>2</sub> , 10мМ MgCl <sub>2</sub>
TB2	50 мМ CaCl <sub>2</sub>

#### Буферные растворы для очистки белков

LSW	25 мМ трис-НСl, 20 мМ КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> , 100 мМ NaCl, рН 7,8
HSW	25 мМ трис-НСl, 20 мМ КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> , 500 мМ NaCl, рН 7,8

#### Растворы для электрофореза белков в полиакриламидном геле (ПААГ)

АА	29% акриламид, 1% N,N'-метилен-бисакриламид
12% разрешающий гель	2/5 от конечного объема геля АА, 375 мМ трис-НСl (рН 8,8), 0,1% SDS, 0,1% APS, 1/1000 от конечного объема геля TEMED
5% концентрирующий гель	1/6 от конечного объема геля АА, 125 мМ трис-НСl (рН 6,8), 0,1% SDS, 0,1% APS, 1/1000 от конечного объема геля TEMED
Электродный буфер	25 мМ трис-НСl, 250 мМ глицин, 0,1% SDS, рН 8,3
Буфер для образцов 4х	200 мМ трис-НСl (рН 6,8), 400 мМ β-меркаптоэтанол, 4% SDS, 40% (v/v) глицерин, 0,1% бромфеноловый синий
Раствор Кумасси G-250	45% (v/v) этанол, 10% (v/v) уксусная кислота, 0,25% Кумасси G-250

### Буферные растворы для вестерн-блот анализа

TS	192 мМ глицин, 25 мМ трис, 20% (v/v) этанол
TBS	50 мМ трис-HCl, 500 мМ NaCl, pH 7.0
TBST	50 мМ трис-HCl, 500 мМ NaCl, 0,2% твин-20, pH 7,0

### Буферный раствор для поверхностного плазмонного резонанса

HBS-PE	0,1 М HEPES, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% (v/v) твин-20, pH 7,4
--------	---

### Буферный раствор для конъюгации белков с флуоресцентными красителями

BB	400 мМ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 70 мМ Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , pH 8,0
----	--

### Микробиологические среды

жидкая среда LB	1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl
LB-агар	1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,6% агар
YTPS	1% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, 20 мМ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 80 мМ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,5

## 2.2 Методы

### *Культивирование эукариотических клеток*

Использованные в работе линии эукариотических клеток представлены в таблице 4. Клетки культивировали в среде McCoys 5A, содержащей 10% (v/v) эмбриональной сыворотки телят и 2 mM L-глутамин (ростовая среда), при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. С целью сохранения рецепторов плазматической мембраны для снятия клеток с подложки использовали раствор Версена.

**Таблица 4.**

Линии эукариотических клеток, используемые в работе

Линия	Номер по каталогу ATCC	Происхождение
SKOV-3	HTB-77	аденокарцинома яичника человека
HeLa	CCL-2	аденокарцинома шейки матки человека
CHO	CCL-61	яичник китайского хомячка
SKOV-kat	---	полученные в данной работе производные клеток SKOV-3, стабильно экспрессирующие красный флуоресцентный белок Katushka (TurboFP635)

### *Получение линии опухолевых клеток SKOV-kat с экспрессией дальнекрасного флуоресцентного белка*

Для получения флуоресцирующей линии SKOV-kat клетки SKOV-3 трансфицировали плазмидой pTurboFP635-N (Евроген), содержащей ген дальнекрасного флуоресцентного белка TurboFP635 (известного также под названием Katushka) [Shcherbo *et al.*, 2007], методом липофекции с использованием реагента Unifectin56 (Unifect Group) в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки SKOV-3 в количестве 200 тыс. в

ростовой среде высаживали на лунку 6-луночного планшета и культивировали до достижения 70% конfluenceности. Плазмидную ДНК (200 нг в 10 мкл среды DMEM без сыворотки) смешивали с реагентом Unifectin56 (1 мкл в 40 мкл среды DMEM без сыворотки), инкубировали 15 мин и добавляли в лунку с клетками. Через сутки среду, содержащую комплекс ДНК с реагентом, заменяли на свежую селективную среду (ростовая среда, содержащая 500 мкг/мл генетицина). Далее в течение 20 суток культивировали клетки в селективной среде с регулярной заменой среды на свежую (раз в 4-5 дней). Стабильно трансфицированные клетки были отсортированы на оптическом проточном цитофлуориметре-сортере Aria III с использованием сопла диаметром 100 мкм при давлении 35 psi. Для возбуждения белка Katushka использовали лазер 561 нм.

Экспрессию белка Katushka в клетках полученной линии SKOV-kat визуализировали методом конфокальной микроскопии с предварительной окраской ядер красителем Hoechst 33258 (1 мкг/мл в PBS) в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте.

### ***Оценка уровня экспрессии рецептора HER2 на поверхности клеток***

Для оценки уровня экспрессии HER2 клетки используемых линий окрашивали HER2-специфичными моноклональными антителами, конъюгированными с FITC (Herceptin-FITC). Для этого клетки в количестве  $0,3 \times 10^6$  ресуспендировали в 500 мкл 3% (w/w) BSA в PBS и инкубировали с 1 мкг конъюгатов Herceptin-FITC или конъюгатов IgG-FITC (изотипический контроль) в течение 30 мин на ротаторе при скорости вращения 15 об/мин, после чего клетки промывали дважды 1% BSA в PBS и анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитофлуориметра FACS Calibur. Для возбуждения FITC использовали аргоновый лазер 488 нм, флуоресценцию FITC регистрировали детектором FL1 (515–545 нм).

## ***Получение флуоресцирующей ксенографтной модели HER2-гиперэкспрессирующей аденокарциномы яичника человека***

Для получения флуоресцирующей ксенографтной опухолевой модели использовали иммунодефицитных мышей линии BALB/c-Nude (самки, 17-23 г, 4-6 недель). Животные были получены из Питомника лабораторных животных Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Пущино) и содержались в ламинарно-поточном шкафу при 24°C и 12-часовом световом режиме. Суспензию клеток SKOV-kat в PBS ( $2 \times 10^6$  клеток/животное) разводили с ростовым субстратом Matrigel в соотношении 1:1 (100 мкл) и вводили животным подкожно в область лопатки.

Для верификации опухоли проводили морфологический анализ образцов опухолевой ткани (Отдел морфологии Центральной научно-исследовательской лаборатории Нижегородской государственной медицинской академии, г. Нижний Новгород).

Для подтверждения экспрессии флуоресцентного белка Katushka в опухолевой ткани получали изображения срезов опухолей и мышечной ткани животных *ex vivo* методом конфокальной микроскопии.

Для подтверждения гиперэкспрессии рецептора HER2 опухолевыми клетками SKOV-kat в сформированной в организме животного опухоли проводили иммуногистохимический анализ опухолевой ткани с использованием набора HercepTest (Dako) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ был выполнен в Нижегородской областной клинической больнице им. Н.А. Семашко (г. Нижний Новгород).

## ***Мониторинг роста опухолей. Флуоресцентный имиджинг***

Мониторинг роста опухолей проводили двумя методами: методом поверхностного флуоресцентного имиджинга и путем оценки размеров опухоли с помощью штангенциркуля.

Для флуоресцентного имиджинга использовали установку, созданную в Институте прикладной физики РАН, г. Н. Новгород [**Shirmanova et al., 2013**]. В качестве источника излучения использовали узкополосный светодиод с максимумом испускания при 585 нм. Сигнал регистрировали с помощью охлаждаемой цифровой CCD-камеры. Для разделения возбуждающего света и эмиссии использовали полосовой интерференционный фильтр 628-672 нм. Полученные изображения анализировали в программе ImageJ (National Institute of Health, USA). Определяли среднюю интенсивность флуоресцентного сигнала в двух областях: по площади опухоли (флуоресцирующей зоны) и по области равной площади, расположенной симметрично относительно позвоночника (фон). Итоговое значение интегральной интенсивности флуоресценции в опухоли рассчитывали за вычетом фона.

Промеры опухолей в соответствии со стандартной методикой проводили два раза в неделю с помощью штангенциркуля. Объем опухолевого узла (V) определяли по формуле Шрека [**Geran, 1972**]:

$$V(\text{мм}^3) = a(\text{мм}) \times b^2(\text{мм}^2)/2,$$

где a – больший, b – меньший диаметры опухолевого узла.

Животных забивали по достижении среднего объема опухоли в контрольной группе 2000 мм<sup>3</sup>.

Для построения кривых опухолевого роста использовали рассчитанные значения объема опухоли и интегральной интенсивности флуоресценции по площади опухоли. Данные эксперимента представляли как среднее ± стандартная ошибка среднего (СОС) в каждой временной точке. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) методом однофакторного дисперсионного анализа, для сравнения опытных групп с контрольной использовали критерий Даннета.

При корреляционном анализе данных, полученных двумя методами, использовали критерий корреляции Пирсона.

## ***Получение рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40***

### *Трансформация клеток E. coli*

Колонию *E. coli* штамма BL21(DE3) петлей переносили в 3 мл жидкой среды LB и инкубировали на шейкере-термостате при 28°C до достижения оптической плотности суспензии ( $OD_{600}$ ) ~ 0,3-0,4 оптических единиц (ОЕ). Затем суспензию клеток охлаждали на ледяной бане, переносили 1,5 мл суспензии в охлажденную стерильную микроцентрифужную пробирку и центрифугировали 30 с при 9000 g и 4°C. Осадок клеток ресуспендировали в 750 мкл раствора TB1 и инкубировали 30 мин при 4°C. Клетки осаждали центрифугированием в том же режиме, после чего осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора TB2 и инкубировали 30 мин при 4°C. К полученным таким образом компетентным клеткам добавляли 1 нг плазмиды pSD-4D5scFv-PE40, содержащей ген 4D5scFv-PE40 под контролем *lac*-промотора (получена в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН), инкубировали 30 мин при 4°C, затем выдерживали 1,5 мин на водяной бане при 42°C и охлаждали 5 мин при 4°C. К суспензии клеток добавляли 1 мл среды LB и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем суспензию центрифугировали, ресуспендировали осадок в 100 мкл среды LB и рассеивали на чашки с селективной средой LB-агар, содержащей 0,1 г/л ампициллина. Чашки инкубировали в течение 14-16 часов при 37°C.

### *Экспрессия и очистка рекомбинантного белка 4D5scFv-PE40*

Для подбора оптимальных условий индукции экспрессии целевого белка ночную культуру свежетрансформированных бактерий разводили в 100 раз средой YTPS, содержащей 0,1 г/л ампициллина, и культивировали на термостате-шейкере при 28°C до достижения  $OD_{600}$  ~ 0,1, 0,6 или 1 ОЕ. Индуцировали *lac*-промотор добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,1, 0,5 или 1 mM, затем суспензию культивировали в течение 4 или 12 ч при 28°C или 37°C. Отобранные образцы суспензии для каждого варианта

сочетания условий индукции осаждали центрифугированием 30 с при 9000 g и 4°C, осадок лизировали буфером B-PER согласно инструкции производителя. Анализ фракций белков бактериального лизата проводили методом электрофореза, как описано ниже.

Оптимальные условия индукции были использованы для наработки большого количества белка и его последующей очистки. После индукции бактериальную суспензию охлаждали на ледяной бане и осаждали центрифугированием 10 мин при 7000 g и 4°C. Все дальнейшие процедуры проводили при 4°C. Осадок клеток ресуспендировали в буфере LSW с добавлением смеси ингибиторов протеаз Protease Inhibitor Cocktail EDTA-Free и лизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора при 22 кГц последовательно 4 раза по 1 мин с перерывами по 5 мин, при постоянном перемешивании и охлаждении суспензии на ледяной бане. Полученный лизат центрифугировали в течение 30 мин при 14000 g и 4°C. Осветленный после центрифугирования лизат, содержащий растворимую форму целевого белка, на первой стадии очищали методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Для этого в надосадочную жидкость добавляли хлорид натрия до концентрации 500 mM и имидазол до концентрации 20 mM, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, затем добавляли глицерин (1/8 от объема полученного лизата) и наносили лизат в нативных условиях на колонку HisTrap FF 1 ml, содержащую Ni<sup>2+</sup>-NTA-сефарозу, согласно инструкциям производителя. Имобилизованный на колонке белок промывали буфером HSW, содержащим 20 mM имидазол, затем элюировали линейным градиентом концентрации имидазола (20-500 mM) в буфере HSW. Собранные фракции, содержащие целевой белок, концентрировали с помощью фильтрующих устройств Amicon Ultra и очищали методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL, уравновешенной буфером PBS. Очищенный белок хранили при +4°C в PBS с добавлением 1mM PMSF.

### *Вертикальный электрофорез в ПААГ*

Белки во фракциях анализировали методом электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях [Laemmli *et al.*, 1970]. Электрофорез проводили при постоянной силе тока 60 мА. По окончании электрофореза гель окрашивали раствором Кумасси G-250 в течение 30 мин, после чего избыток краски отмывали 10% (v/v) раствором уксусной кислоты до прозрачного фона. Для определения молекулярной массы использовали маркер молекулярных весов PageRuler.

### *Вестерн-блот анализ*

Белки, разделенные в ПААГ после электрофореза, переносили на PVDF мембрану полусухим методом в буфере TB в течение 30 мин при постоянном напряжении 6 В. По окончании переноса инкубировали мембрану в течение 1 ч при комнатной температуре в 5% (w/w) растворе обезжиренного сухого молока, приготовленном на буфере TBS, для блокировки неспецифического связывания антител. Используемые для иммунодетекции антитела разводили в соответствии с рекомендациями производителя в 0,5% (w/w) растворе молока на TBS. Инкубировали мембрану в течение 1 ч при комнатной температуре с мышинными моноклональными анти-гистициновыми антителами, затем отмывали мембрану трижды по 5 мин буферами TBST и TBS при покачивании. Затем инкубировали мембрану в течение 1 ч при комнатной температуре с козьими анти-мышинными моноклональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Повторяли процедуру отмывки, после чего инкубировали мембрану в растворе субстрата пероксидазы TMB до появления окрашенных полос. Реакцию останавливали промывкой мембраны дистиллированной водой.

## *Оценка противоопухолевой эффективности терапевтических агентов*

Животных разделяли на четыре группы по пять животных в каждой, в соответствии с вариантом терапевтического воздействия. Животным первой группы (контрольной) внутрибрюшинно вводили 100 мкл PBS через 24 ч после инъекции опухолевых клеток. Животным второй группы внутрибрюшинно вводили иммунотоксин 4D5scFv-PE40 в дозе 50 пмоль/животное в 100 мкл PBS через 24 ч после инъекции опухолевых клеток. Третьей группе животных внутрибрюшинно вводили цисплатин в разовой дозе 200 мкмоль/животное в 100 мкл PBS трехкратно на 3, 5 и 7 дни после инъекции опухолевых клеток. Животным четвертой группы вводили 4D5scFv-PE40 и цисплатин по указанным выше схемам.

Коэффициенты торможения роста опухоли (ТРО) [Хабриев, 2005] рассчитывали по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = \frac{I_k - I_0}{I_k} \times 100\%, \text{ где}$$

$I_k$  и  $I_0$  – усредненные значения интегральной флуоресценции по площади опухоли в контрольной и опытной группах, соответственно, в выбранной временной точке.

Начальную стадию кривой опухолевого роста описывали уравнением  $F = F_0 \times e^{kt}$ , где  $F_0$  – значение интегральной флуоресценции опухоли в начальный момент времени,  $k$  – коэффициент скорости роста опухоли (GraphPad Prism 6). Значения  $k$  определяли путем линеаризации экспоненциальной фазы роста опухоли (логарифмирования значений интегральной флуоресценции опухоли) с последующей линейной аппроксимацией. Значения периода удвоения опухоли рассчитывали по формуле  $\ln 2/k$ . Данные представляли как среднее  $\pm$  СОС.

### ***МТТ-тест жизнеспособности клеток***

Цитотоксический эффект иммунотоксина 4D5scFv-PE40 определяли методом МТТ-теста [Mosmann, 1983] для линий клеток CHO, HeLa, SKOV-3 и SKOV-kat (табл. 4). Клетки высаживали на 96-луночные планшеты в количестве  $3 \times 10^3$  (SKOV-3, SKOV-kat, HeLa) или  $1,5 \times 10^3$  (CHO) клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем ростовую среду заменяли на свежую, содержащую различные концентрации рекомбинантных белков 4D5scFv-PE40, 4D5scFv или PE40. Инкубировали клетки в присутствии исследуемых белков в течение 72 ч при 37°C.

По окончании инкубации клетки промывали PBS и инкубировали в свежей среде, содержащей 0,5 мг/мл МТТ в течение 1 ч. Образовавшиеся кристаллы формазана лизировали в DMSO, затем измеряли оптическую плотность в лунках при 570 нм, используя планшетный спектрофотометр Synergy MX. Данные экспериментов представляли как среднее  $\pm$  СОС. Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали как отношение усредненной оптической плотности в лунках с обработанными клетками к усредненной оптической плотности в лунках с необработанными (контрольными) клетками и выражали в процентах. Расчет IC<sub>50</sub> (концентрации исследуемого белка, приводящей к снижению относительной жизнеспособности клеток вдвое относительно контроля) проводили в программе GraphPad Prism 6 методом нелинейной регрессии с использованием четырехпараметрической модели «доза-эффект».

### ***Оценка аффинности взаимодействия 4D5scFv-PE40 с рецептором HER2***

Равновесные константы диссоциации комплексов иммунотоксина 4D5scFv-PE40 или антитела 4D5scFv с рецептором HER2 были определены в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием оптического биосенсора ВІАcore

3000. Рекомбинантный внеклеточный домен HER2 ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметил-декстранового чипа CM5 согласно инструкциям производителя. Плотность рецептора на чипе составляла 4500 у.е. Иммунотоксин 4D5scFv-PE40 использовали в концентрациях 350, 250, 70 и 50 нМ, антитело 4D5scFv использовали в концентрациях 120, 90 и 60 нМ в буфере HBS-PE. Сенсограммы получали при скорости потока 5 мкл/мин при 25°C. Фаза диссоциации продолжалась 20 мин.

### ***Конъюгация 4D5scFv-PE40 с флуоресцентными красителями***

Полученный рекомбинантный белок 4D5scFv-PE40 конъюгировали с аминореактивными флуоресцентными красителями FITC и DyLight650 NHS Ester. Для проведения реакции конъюгации белок переводили в буфер ВВ методом гель-фильтрации на колонке PD SpinTrap G-25. Инкубировали белок с 5-кратным (в случае FITC) или 7-кратным (в случае DyLight650) молярным избытком красителя, разведенного в DMSO, течение 1 ч при комнатной температуре в темноте в соответствии с рекомендациями производителя. Несвязавшийся краситель в обоих случаях удаляли методом гель-фильтрации на колонке PD SpinTrap G-25, уравновешенной PBS. Полученные конъюгаты хранили в непрозрачных пробирках при 4°C в течение 1 месяца.

### ***Изучение специфичности связывания 4D5scFv-PE40 с HER2 на поверхности клеток***

Клетки линий SKOV-3 (HER2-гиперэкспрессирующие) и CHO (HER2-негативные), высаживали на тонкодонные 96-луночные планшеты в количестве  $5 \times 10^3$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем инкубировали клетки в течение 1 ч при 37°C в среде, содержащей 500 нМ иммунотоксина 4D5scFv-PE40, меченного DyLight650. По окончании инкубации клетки отмывали трижды PBS, фиксировали 10% (v/v) раствором

формалина, приготовленным на PBS, в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте и снова отмывали трижды PBS. Для контрастирования ядер клетки инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре в PBS, содержащем 1 мкг/мл DAPI. Клетки анализировали методом конфокальной микроскопии.

Специфичность связывания иммунотоксина 4D5scFv-PE40 с рецептором HER2 подтверждали также конкурентным ингибированием связывания свободным антителом 4D5scFv. Для этого клетки SKOV-3 и CHO снимали с культуральных флаконов и инкубировали на ротаторе в течение 1 ч при 37°C в среде, содержащей 100 нМ конъюгатов 4D5scFv-PE40-DyLight650 в отсутствие или в присутствии 100 нМ 4D5scFv. Затем клетки осаждали при 200 g и ресуспендировали в PBS, повторяли процедуру отмывки трижды. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur. Для возбуждения DyLight650 использовали полупроводниковый лазер 635 нм, флуоресценцию DyLight650 регистрировали детектором FL4 (653–669 нм).

#### ***Исследование механизма интернализации 4D5scFv-PE40***

Клетки линии SKOV-3 высаживали на тонкодонные 96-луночные планшеты в количестве  $5 \times 10^3$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем преинкубировали клетки в течение 30 мин при 37°C в среде, содержащей ингибитор клатрин- или кавеолин-зависимого эндоцитоза: 5 мкг/мл хлорпромазина или 5 мкг/мл филипина, соответственно. После этого клетки инкубировали течение 2 ч при 37°C в среде, содержащей 500 нМ конъюгатов 4D5scFv-PE40-FITC и тот или другой ингибитор в указанной выше концентрации. По окончании инкубации клетки отмывали трижды PBS, фиксировали 10% (v/v) раствором формалина, приготовленным на PBS, в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте и снова отмывали трижды PBS. Клетки анализировали методом конфокальной микроскопии.

### ***Определение внутриклеточной локализации 4D5scFv-PE40***

Клетки линии SKOV-3 высаживали на тонкодонные 96-луночные планшеты в количестве  $5 \times 10^3$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем инкубировали клетки в среде, содержащей 500 нМ конъюгатов 4D5scFv-PE40-DyLight650, в течение различного времени: от 1 до 3 ч. По окончании инкубации клетки трижды отмывали PBS и окрашивали специфичными флуоресцентными красителями органелл: лизосом (LysoTracker Green), аппарата Гольджи (Bodipy FL C5-ceramide) и ЭПР (ER-Tracker Green), в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ клеток проводили методом конфокальной микроскопии.

### ***Оценка интенсивности биосинтеза белка в клетках***

Клетки линии SKOV-3 высаживали на тонкодонные 96-луночные планшеты в количестве  $5 \times 10^3$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем ростовую среду заменяли на свежую, содержащую различные концентрации 4D5scFv-PE40, и инкубировали клетки в течение 24 ч при 37°C. Биосинтез белка в клетках оценивали с помощью набора Click-iT АНА Alexa Fluor 488 Protein Synthesis HCS Assay в соответствии с рекомендациями производителя в два этапа. Сначала клетки инкубировали в безметиониновой ростовой среде в присутствии L-азидогомоаланина (аминокислоты-аналога метионина, содержащей азидную группу). Затем клетки фиксировали 10% (v/v) раствором формалина, приготовленным на PBS, пермеабелизовали раствором 0,5% тритона X-100 в PBS и детектировали встроенный в полипептидные цепи L-азидогомоаланин с помощью алкинового производного флуоресцентного красителя Alexa Fluor 488 («click-реакция» азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая медью). Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 в соответствии с рекомендациями производителя набора. Клетки анализировали методом

конфокальной микроскопии. На полученных изображениях с помощью программы ZEN 2 (Carl Zeiss) рассчитывали интегральную флуоресценцию Alexa Fluor 488 в цитоплазме клеток за вычетом автофлуоресценции. Полученные значения усредняли по нескольким полям зрения (общее количество проанализированных клеток для каждой концентрации иммунотоксина – не менее 20), данные представляли как среднее  $\pm$  СОС. Относительную интенсивность биосинтеза белка рассчитывали как отношение интегральной флуоресценции цитоплазмы клеток, обработанных иммунотоксином, к интегральной флуоресценции цитоплазмы необработанных (контрольных) клеток и выражали в процентах. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 методом однофакторного дисперсионного анализа, для сравнения с контролем использовали критерий Даннета. Расчет  $IC_{50}$  (концентрации иммунотоксина, снижающей интенсивность биосинтеза белка вдвое относительно контроля) проводили в программе GraphPad Prism 6 методом нелинейной регрессии с использованием четырехпараметрической модели «доза-эффект».

### ***Конфокальная микроскопия***

Изображения клеток SKOV-kat *in vitro* и тканей животного (опухолевой и мышечной) *ex vivo* получали с помощью лазерного сканирующего микроскопа Axiovert 200M LSM 510 META NLO с использованием 63 $\times$  масляно-иммерсионного объектива Plan-Apochromat (NA 1,4) и 40 $\times$  масляно-иммерсионного объектива EC Plan-Neofluar (NA 1,3), соответственно. Для визуализации флуоресцентного белка Katushka и ядерного красителя Hoechst 33258 использовали, соответственно: гелий-неоновый лазер 543 нм и диапазон регистрации флуоресценции 560–700 нм, титан-сапфировый фемтосекундный лазер Mai Tai HP (Spectra Physics, USA) 720 нм и диапазон регистрации флуоресценции 390–465 нм.

Изображения клеток в рамках исследования специфичности связывания, интернализации, внутриклеточной локализации 4D5scFv-PE40 и его влияния на биосинтез белка получали на лазерном сканирующем микроскопе Axio Observer Z1 LSM 710 DUO NLO с использованием 40× водно-иммерсионного объектива C-Apochromat (NA 1,2). Для возбуждения красителей FITC, Alexa Fluor 488 и красителей органелл (LysoTracker Green, Bodipy FL C5-ceramide, ER-Tracker Green) использовали аргоновый лазер 488 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 505-600 нм, 507-585 нм и 509-566 нм, соответственно. Краситель DyLight650 возбуждали с помощью гелий-неонового лазера 635 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 643-735 нм. Для визуализации ядерных красителей DAPI и Hoechst33342 использовали, соответственно: диодный лазер 405 нм и диапазон регистрации флуоресценции 421-485 нм, титан-сапфировый фемтосекундный лазер Chameleon Vision II (Coherent Inc., USA) 750 нм и диапазон регистрации флуоресценции 415-498 нм.

### *Анализ механизма клеточной гибели*

#### *Экстернализация фосфатидилсерина*

В качестве одного из ранних признаков апоптоза анализировали экстернализацию фосфатидилсерина. Клетки линии SKOV-3 высаживали на 6-луночные планшеты в количестве  $2 \times 10^5$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем ростовую среду в лунках заменяли на свежую, содержащую 50 нМ 4D5scFv-PE40, и инкубировали клетки в течение 24, 48 или 72 ч при 37°C. Затем клетки снимали с подложки и окрашивали FITC-меченным аннексином V и йодистым пропидием (PI) с помощью набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ образцов проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитофлуориметра-сортера FACS Aria III. Для возбуждения FITC и PI использовали аргоновый лазер 488 нм,

регистрацию флуоресценции FITC и PI проводили в диапазоне 515–545 нм и 564–606 нм, соответственно.

### *Фрагментация ядер*

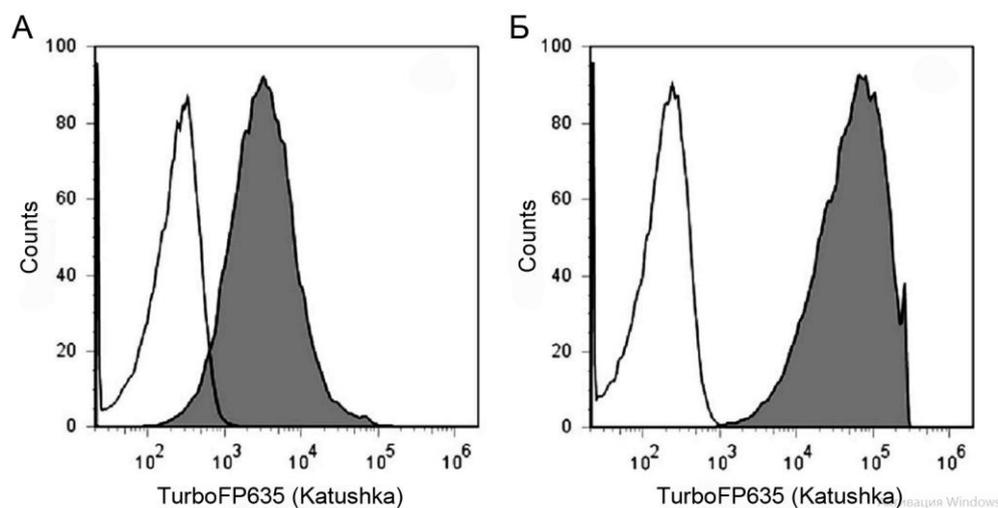
В качестве признака, характерного для поздних стадий апоптоза, анализировали фрагментацию ядер. Клетки линии SKOV-3 высаживали на 6-луночные планшеты в количестве  $4 \times 10^5$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем ростовую среду в лунках заменяли на свежую, содержащую 50 нМ 4D5scFv-PE40, и инкубировали клетки в течение 24, 48 или 72 ч при 37°C. По окончании инкубации клетки снимали с подложки, выделяли ядра и окрашивали их PI с помощью набора Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit, в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur. Для возбуждения PI использовали аргоновый лазер 488 нм, флуоресценцию PI регистрировали ФЭУ детектором FL2 (564–606 нм).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

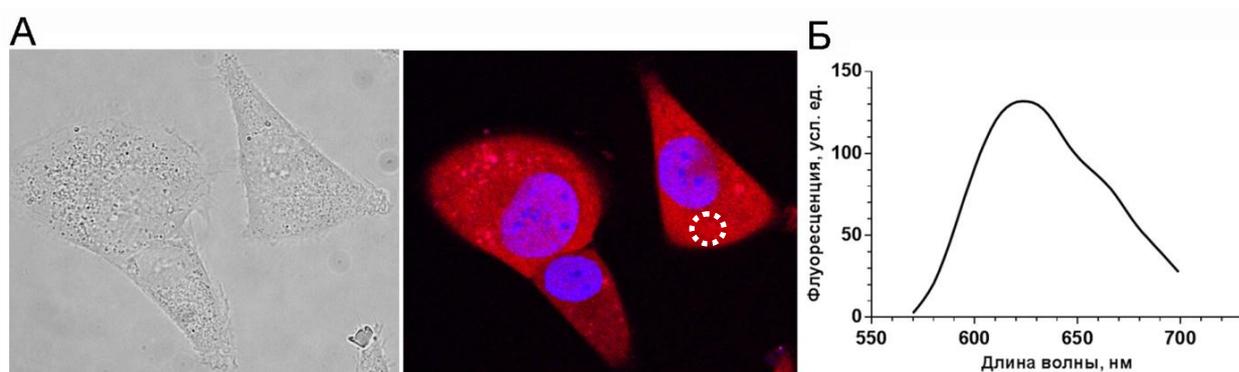
### 3.1 Получение ксенографтной опухолевой модели на основе линии опухолевых клеток, экспрессирующих дальнекрасный флуоресцентный белок

Нами была получена клеточная линия SKOV-kat, представляющая собой производную линии HER2-гиперэкспрессирующей аденокарциномы яичника человека SKOV-3, клетки которой были стабильно трансфицированы геном флуоресцентного белка Katushka с цитоплазматической локализацией. Белок Katushka (TurboFP635) был выбран нами как оптимальный по сочетанию эмиссии в области «терапевтического окна прозрачности» биоткани (максимум спектра флуоресценции при 635 нм) и высоких значений молярного коэффициента экстинкции ( $65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) и квантового выхода флуоресценции (0,34), что в совокупности обеспечивает его эффективную визуализацию в организме модельного животного [Shcherbo *et al.*, 2007].

В результате трех последовательных циклов «культивирование – оптическая сортировка» удалось достичь высокой интенсивности флуоресценции клеток SKOV-kat, в 20–30 раз превышающей таковую первичных трансфектантов (рис. 9). Показано, что цитоплазма полученных клеток SKOV-kat обладает яркой и равномерной флуоресценцией в красной области спектра (рис. 10А) с максимумом при  $\approx 635$  нм, что соответствует максимуму излучения белка Katushka (рис. 10Б). Стабильность трансфекции была подтверждена культивированием SKOV-kat в отсутствие селектирующего антибиотика в течение 5 лет с многократной заморозкой и разморозкой клеток.



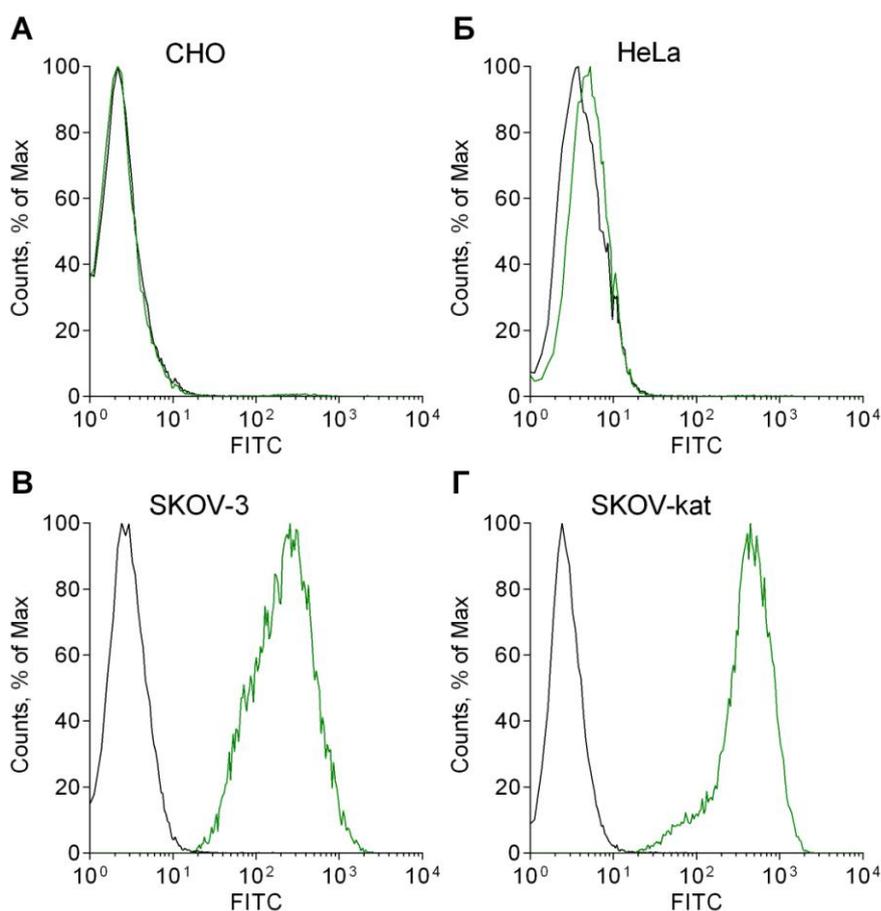
**Рисунок 9.** Оптическая сортировка клеток SKOV-kat. Представлены распределения трансфицированных клеток SKOV-kat (серая заливка) и клеток родительской линии SKOV-3 (прозрачная гистограмма) до сортировки (А) и после трех циклов «культивирование – сортировка» (Б).



**Рисунок 10.** Клетки SKOV-kat, экспрессирующие флуоресцентный белок Katushka в цитоплазме. А – изображение клеток в проходящем свете (слева) и флуоресцентное изображение (справа): красный канал – белок Katushka ( $\lambda_{ex}$  543 нм,  $\lambda_{em}$  560–700 нм), синий канал – ядра, окрашенные Hoechst 33258 ( $\lambda_{ex}$  720 нм,  $\lambda_{em}$  390–465 нм); Б – спектр флуоресценции в области, выделенной пунктиром на рис. А. Размер всех изображений 90×80 мкм.

Для исследования экспрессии рецептора HER2 клетками полученной линии оценивали содержание рецептора на мембране клеток SKOV-kat в сравнении с клетками родительской линии SKOV-3, а также клетками линий HeLa и CHO, для которых по данным литературы известна гиперэкспрессия, низкая экспрессия и отсутствие экспрессии HER2, соответственно [Dean *et al.*, 1998, McCluskey *et al.*, 2013, Wen *et al.*, 2006]. На рисунке 11

представлены гистограммы, полученные методом проточной цитофлуориметрии после окраски клеток HER2-специфичными антителами, меченными FITC (Herceptin-FITC). Сдвиг пика интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных Herceptin-FITC, относительно пика интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных IgG-FITC (изотипический контроль), свидетельствует о практическом отсутствии рецептора HER2 на мембране клеток CHO (рис. 11А), низком содержании HER2 на мембране HeLa (рис. 11Б), высоком (гиперэкспрессия) – на мембране клеток SKOV-3 (рис. 11В) и SKOV-kat (рис. 11Г). Таким образом, процедура трансфекции клеток не повлияла на экспрессию ими рецептора-онкомаркера HER2.



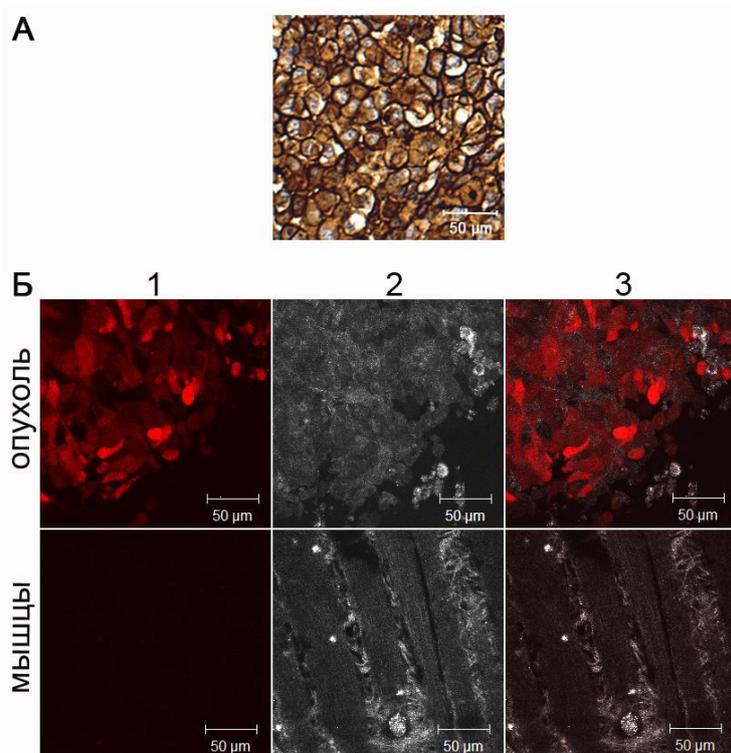
**Рисунок 11.** Анализ уровня экспрессии рецептора HER2 клетками методом проточной цитофлуориметрии. Представлены распределения клеток CHO (А), HeLa (Б), SKOV-3 (В) и SKOV-kat (Г) по интенсивности флуоресценции после окрашивания HER2-специфичными конъюгатами Herceptin-FITC (зеленая линия) или конъюгатами IgG-FITC (изотипический контроль, черная линия).  $\lambda_{\text{ex}}$  488 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  515–545 нм.

Важной особенностью полученной линии SKOV-kat является ее поликлональность. Известно, что злокачественные опухоли характеризуются генотипической, эпигенетической и фенотипической гетерогенностью вследствие высокой нестабильности и клонального разнообразия опухолевых клеток. Именно эти особенности обуславливают частую неэффективность диагностики, прогнозирования и лечения заболевания [Gerashchenko *et al.*, 2013, Pribluda *et al.*, 2015]. В связи с этим, поликлональная линия опухолевых клеток представляется перспективной для создания на ее основе ксенографтной опухолевой модели, предназначенной для мониторинга роста опухоли и оценки эффективности терапевтических агентов.

Для получения флуоресцирующей ксенографтной опухолевой модели клетки SKOV-kat были привиты вместе с ростовым субстратом (Matrigel) подкожно иммунодефицитным мышам-самкам линии *nude*. На месте инъекции в течение 24 суток формировались опухолевые узлы с типичной морфологической структурой: опухолевые клетки имели крупные размеры и светлую вакуолизированную цитоплазму, очагов некроза обнаружено не было. Анализ *ex vivo* образцов сформировавшейся опухоли показал сохранение гиперэкспрессии рецептора HER2 (рис. 12А) и экспрессии белка Katushka (рис. 12Б) в опухолевой ткани. Изображение мышечной ткани животного, полученное при аналогичных настройках (рис. 12Б), свидетельствует о практическом отсутствии автофлуоресценции в данном диапазоне длин волн, что обеспечивает большой контраст при визуализации целевого флуорофора.

В последнее десятилетие активное использование флуоресцентных белков для визуализации опухолевых клеток привело к созданию большого количества флуоресцирующих опухолевых моделей, предназначенных для решения широкого спектра задач экспериментальной онкологии – от изучения фундаментальных процессов роста и развития опухоли до прижизненной количественной оценки эффективности препаратов [Hoffman,

2016]. В то же время, вместе со стремительным развитием таргетной противоопухолевой терапии встает необходимость создания и использования специфических экспериментальных моделей, клетки которых должны экспрессировать конкретные молекулярные мишени (белки человека), определяющие специфичность действия тестируемого агента. Известны две основные стратегии, направленные на достижение иммунологической толерантности животного к человеческим антигенам (мишеням): (1) получение трансгенных животных, клетки которых экспрессируют антиген человека, с возможностью перевивки таким животным сингенных опухолей, также (гипер)экспрессирующих данный антиген, и (2) перевивка опухолевых клеток человека, гиперэкспрессирующих антиген-мишень, иммунодефицитным животным, т.е. создание ксенографтных моделей опухоли. Большое распространение для задач оценки эффективности таргетных агентов получил второй подход, являющийся более простым [Piechocki *et al.*, 2003, Ruggeri *et al.*, 2014].



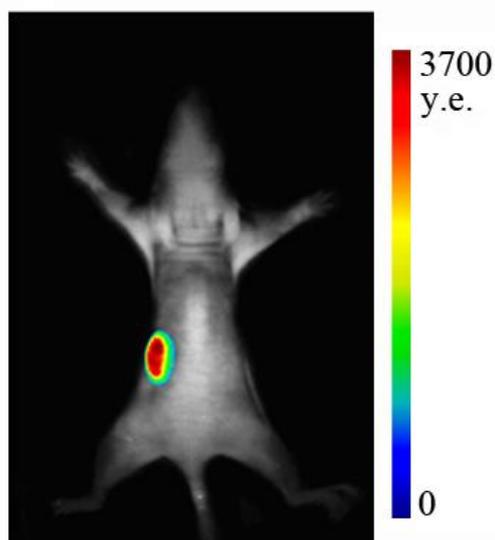
**Рисунок 12.** Ксенографтная опухолевая модель SKOV-kat. **А** – иммуногистохимический препарат опухоли: интенсивная коричневая окраска свидетельствует о высокой экспрессии рецептора HER2; **Б** – опухолевая и мышечная ткани: (1) изображения в красном канале ( $\lambda_{ex}$  543 нм,  $\lambda_{em}$  560–700 нм) (2) изображения в отраженном свете (3) комбинированные изображения

Важной задачей биомедицинских исследований в настоящее время является разработка таргетных препаратов, специфичных к клинически значимому рецептору-онкомаркеру HER2, что диктует необходимость получения соответствующих опухолевых моделей для высокоэффективных доклинических исследований потенциальных агентов. Так, были созданы ксенографтные модели HER2-гиперэкспрессирующих карцином молочной железы [Wu *et al.*, 2013] и желудка человека [Sato *et al.*, 2014], экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок GFP. Однако, в силу оптических свойств биоткани (см. п. 1.1.2) эффективная прижизненная визуализация опухоли в организме небольшого животного становится возможной при использовании флуорофоров с максимумом излучения более 600 нм. В данной работе нами впервые получена ксенографтная модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека, характеризующаяся стабильной флуоресценцией с максимумом при 635 нм за счет экспрессии опухолевыми клетками дальнекрасного флуоресцентного белка Katushka. Полученная модель может быть полезна при исследовании терапевтического потенциала разрабатываемых HER2-специфичных препаратов, особенно в свете отсутствия одобренных таргетных агентов для лечения HER2-положительного рака яичника и безусловной необходимости разработки таковых.

### **3.2 Мониторинг развития флуоресцирующих опухолей и их ответа на терапевтическое воздействие**

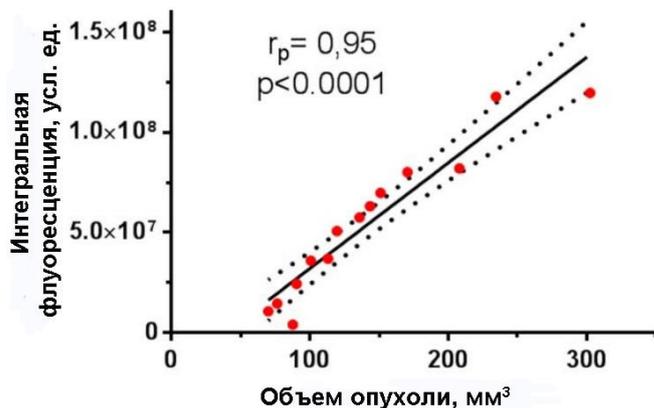
Стабильная экспрессия флуоресцентного белка клетками SKOV-kat обеспечила возможность визуализации экспериментальных опухолей методом поверхностного флуоресцентного имиджинга с момента инъекции 2 млн клеток и в дальнейшем в течение всего времени развития опухоли. Были получены двумерные изображения животных-опухоленосителей, позволяющие количественно рассчитать интегральную интенсивность

флуоресценции по площади опухоли (рис. 13).



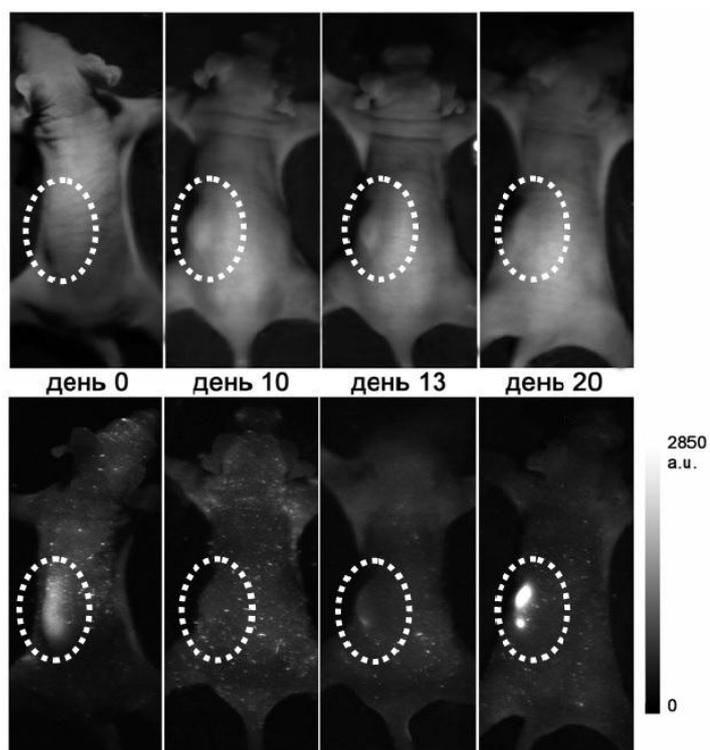
**Рисунок 13.** Прижизненное изображение животного. Область флуоресцирующей опухоли наложена в радужной палитре интенсивности флуоресцентного сигнала на изображение в отраженном свете ( $\lambda_{\text{ex}}$  585 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  628–672 нм).

Поскольку стандартным методом мониторинга роста подкожных опухолей является мониторинг изменения объема опухолевого узла, рассчитанного на основе его внешних поперечных размеров [Миронов, 2012, Хабриев, 2005], необходимым шагом было выяснение соответствия данных, получаемых двумя методами. Нами показано, что для опухолей объемом менее  $300 \text{ мм}^3$  наблюдается высокая корреляция показателя интегральной интенсивности флуоресценции опухоли и ее объема (коэффициент корреляции Пирсона  $r_p$  составил 0,95 при  $p < 0,0001$ ) (рис. 14). Очевидно, что при таких размерах опухоли эффекты перепоглощения и экранирования света пренебрежимо малы, и интенсивность флуоресценции отражает количество опухолевых клеток в узле. Стоит подчеркнуть, что соответствие чрезвычайно регистрируемой флуоресценции опухоли ее внешнему размеру при использовании дальнекрасного белка *Katushka* оказалось существенно выше, чем в случае использования более коротковолнового ( $\lambda_{\text{em}}$  588 нм) красного флуоресцентного белка *DsRed2* ( $r_s$  0,74) [Puaux *et al.*, 2011]. Это, вероятно, объясняется сильным поглощением более коротковолнового света кожей животного.



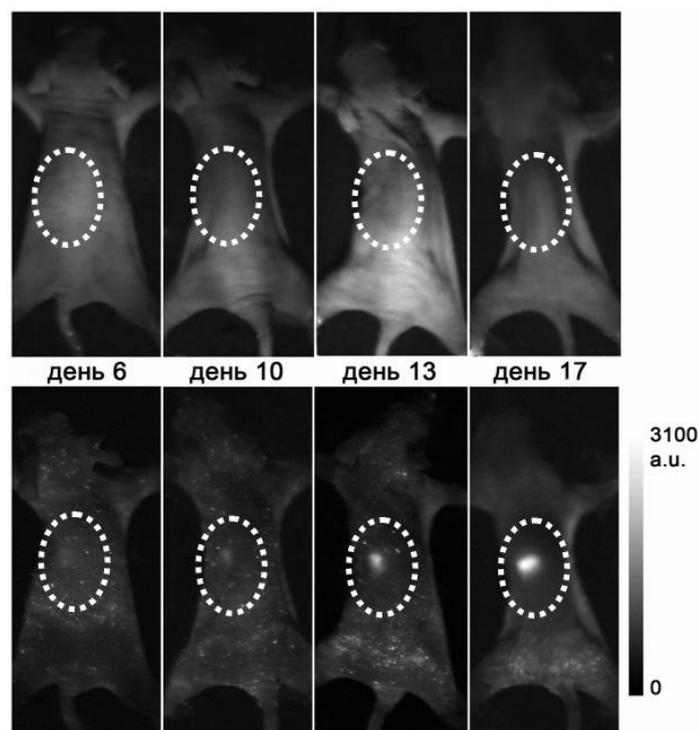
**Рисунок 14.** Корреляционный анализ данных, полученных методом флуоресцентного имиджинга и стандартной методикой оценки внешних размеров опухоли ( $r_p$  – критерий корреляции Пирсона).

Таким образом, поверхностный флуоресцентный имиджинг подкожной опухоли на начальной стадии ее развития представляет адекватную альтернативу стандартной методике оценки внешних размеров опухоли. При этом флуоресцентный имиджинг характеризуется большей информативностью, по сравнению со стандартной методикой. Нами подтверждена большая специфичность флуоресцентного имиджинга в отношении визуализации опухолевых клеток. Использование ростового субстрата приводит к формированию «узла» в месте инъекции, сохраняющегося в течение нескольких дней (рис. 15, верхний ряд), что приводит к завышенной оценке размера опухоли. Однако, на последовательных флуоресцентных изображениях видно, что часть инъецированных клеток погибла, а флуоресцентный сигнал от выживших клеток усиливается на значительно более позднем изображении (рис. 15, нижний ряд). Аналогично, на более поздних этапах роста опухоли в ее состав может входить, помимо самих опухолевых клеток, соединительнотканная строма, что также сказывается на внешнем размере узла, но не может быть учтено с помощью стандартной методики.



**Рисунок 15.** Оценка количества опухолевых клеток на месте инъекции с ростовым субстратом методом флуоресцентного имиджинга. Представлены изображения в отраженном свете (верхний ряд) и флуоресцентные изображения (нижний ряд), полученные через разные сроки после инъекции клеток SKOV-kat. Область инъекции выделена пунктиром.

Флуоресцентный имиджинг является и более чувствительным, позволяя визуализировать непальпируемую опухоль: на рисунке 16 видно, что флуоресцентные изображения дают информацию о локализации опухолевого очага и его росте, в то время как внешне опухоль не выявляется. Подобным образом с помощью данного метода возможна визуализация поверхностных метастазов, представляющих собой частный случай непальпируемой опухоли. Показанные преимущества флуоресцентного подхода позволяют более корректно оценивать динамику роста опухоли, что особенно важно при исследовании противоопухолевого эффекта потенциальных терапевтических агентов.

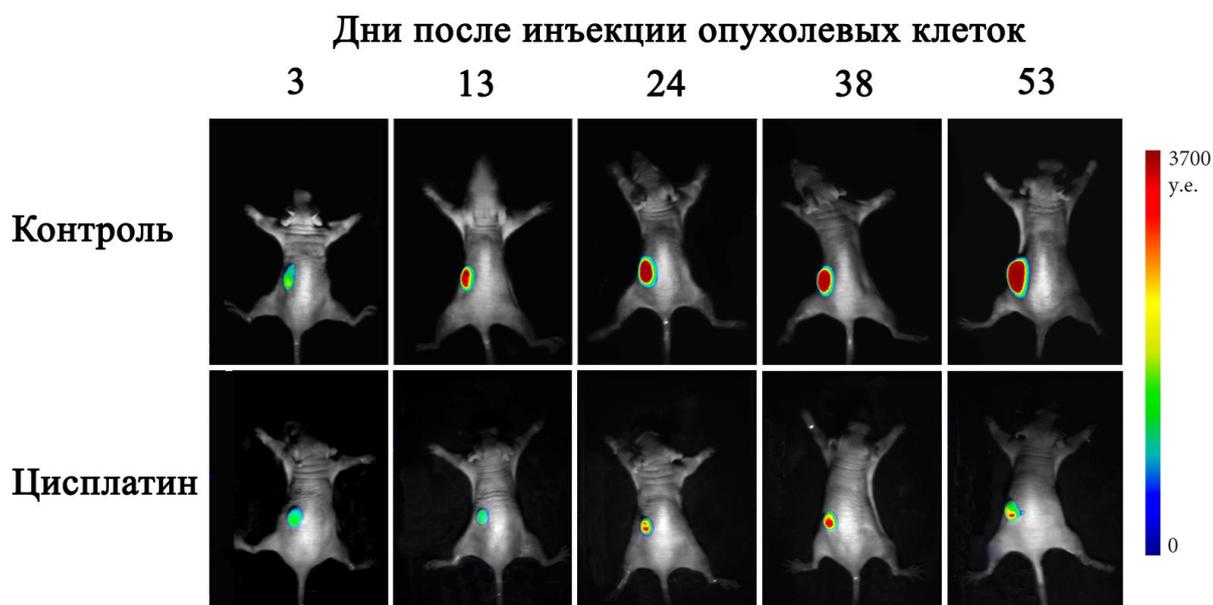


**Рисунок 16.** Визуализация непальпируемой опухоли методом флуоресцентного имиджинга. Представлены изображения в отраженном свете (верхний ряд) и флуоресцентные изображения (нижний ряд), полученные через разные сроки после инъекции клеток SKOV-kat. Область инъекции выделена пунктиром.

Стоит также подчеркнуть, что использование данного подхода исключает необходимость регулярного забоя животных для морфологической верификации опухоли, что значительно оптимизирует эксперимент как с финансовой, так и с этической точки зрения.

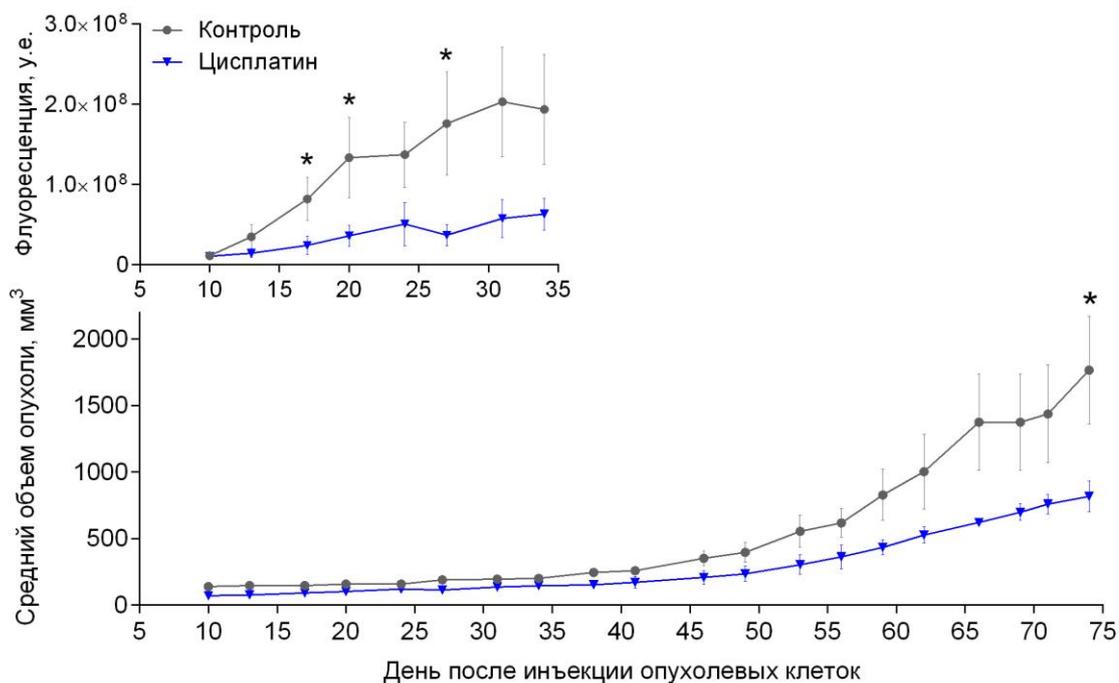
Нами была проведена апробация полученной флуоресцирующей опухолевой модели для мониторинга роста опухоли на фоне терапевтического воздействия. На последовательных изображениях животного контрольной группы и животного после введения химиопрепарата цисплатина (рис. 17) хорошо видно увеличение флуоресцентного сигнала опухолей с течением времени: цисплатин вызывал значительное замедление роста опухоли по сравнению с контролем. При этом флуоресцентный имиджинг позволил выявить достоверный эффект цисплатина уже на 17-ый день после инъекции опухолевых клеток (рис. 18А), в то время как

статистически значимая разница в объеме опухолей опытной и контрольной групп была обнаружена только на 74-й день (рис. 18Б).



**Рисунок 17.** Последовательные прижизненные изображения животных после введения PBS (контроль) или цисплатина (троекратно на 3, 5 и 7 дни после инъекции опухолевых клеток, в разовой дозе 200 мкмоль/животное). Область флуоресцирующей опухоли наложена в радужной палитре интенсивности флуоресцентного сигнала на изображение в отраженном свете.

Таким образом, флуоресцентный имиджинг полученной опухолевой модели обеспечивает количественную оценку роста опухоли и эффективную визуализацию терапевтического эффекта тестируемого агента на ранних стадиях развития опухоли.

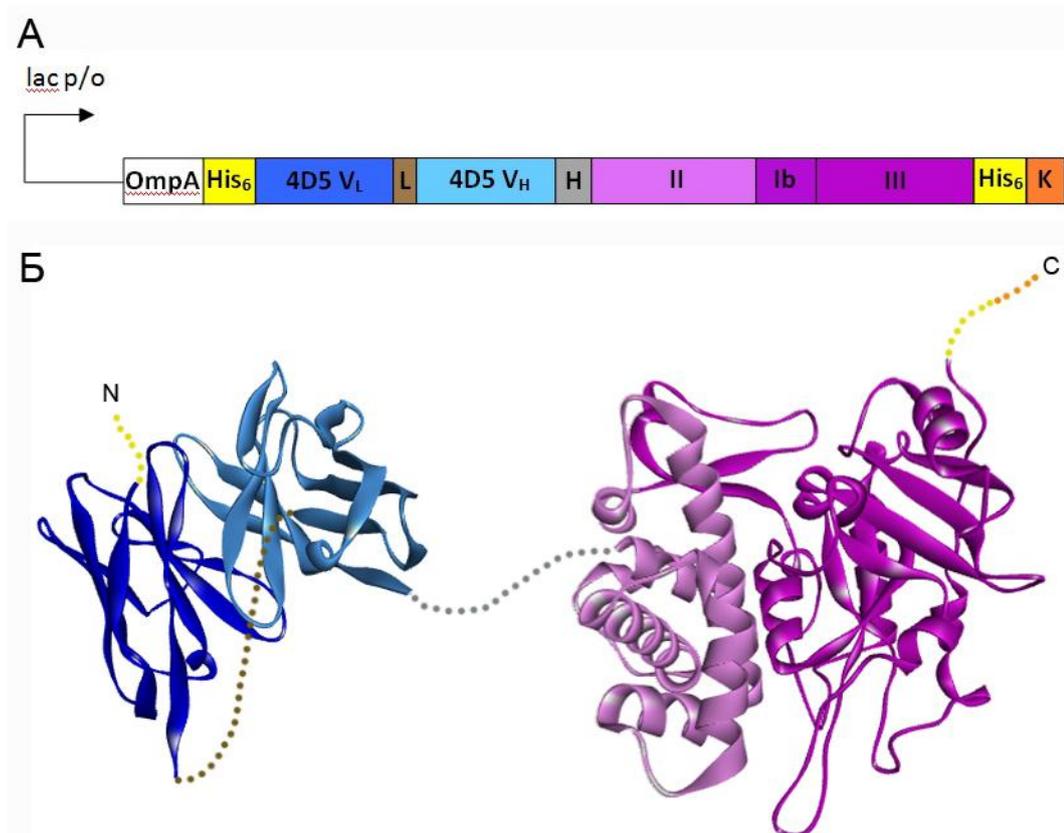


**Рисунок 18.** Динамика роста ксенографтных опухолей SKOV-kat на основе интегральной флуоресценции по площади опухоли (А) и внешнего объема опухоли (Б). Планки погрешностей представлены стандартной ошибкой среднего; \* –  $p < 0,05$ , сравнение с контролем по критерию Даннета,  $n=4-5$ .

### 3.3 Рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40 и оценка его эффективности на полученной флуоресцирующей опухолевой модели

#### Структура 4D5scFv-PE40

Имунотоксин 4D5scFv-PE40, созданный нами в ходе работы, представляет собой рекомбинантный (слитый) белок, состоящий из двух функциональных модулей – направляющего и токсического (рис. 19). Направляющим модулем иммунотоксина 4D5scFv-PE40 является антитело 4D5scFv [Eigenbrot *et al.*, 1993], представляющее собой переменные домены легкой и тяжелой цепей HER2-специфичного полноразмерного предшественника huMab4D5-8 [Carter *et al.*, 1992], применяющегося в клинике для таргетной терапии HER2-гиперэкспрессирующих карцином молочной железы и желудка под коммерческим названием Herceptin.



**Рисунок 19.** Рекombинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40.

**А** – схема генетической конструкции, кодирующей 4D5scFv-PE40. Показаны участки, кодирующие: **OmpA** (белый) – сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию целевого рекомбинантного белка в периплазматическое пространство; **His<sub>6</sub>** (желтый) – олигогистидиновый пептид, обеспечивающий очистку белка методом металл-хелатной аффинной хроматографии; **4D5 V<sub>L</sub>** (синий), **4D5 V<sub>H</sub>** (голубой) и **L** (бурый) – переменные домены легкой и тяжелой цепей анти-HER2 антитела huMab4D5-8 и соединяющий их линкер (21 а.о.), соответственно; **H** (серый) – гидрофильный hinge-подобный линкер (16 а.о.); **II** (бледно-сиреневый), **Ib** и **III** (темно-сиреневый) – домены фрагмента PE40 экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*; **K** (оранжевый) – олигопептид KDEL.

**Б** – трехмерная модель 4D5scFv-PE40 (ленточная диаграмма), полученная на основе данных рентгеноструктурного анализа экзотоксина А дикого типа (код PDB: 1IKQ) и 4D5scFv (код PDB: 1FVC) в программе Discovery Studio Visualizer 2016 (Biovia, USA). Цветовые обозначения такие же, как на рис. 19А.

Антитело 4D5scFv является высокостабильным и высокоаффинным, а также характеризуется высоким выходом экспрессии в *E. coli* [Willuda *et al.*, 1999]. Это антитело зарекомендовало себя как эффективный направляющий

агент при создании бифункциональных цитотоксических белков в ряде работ как нашей [Balandin *et al.*, 2011, Edelweiss *et al.*, 2008, Mironova *et al.*, 2013, Serebrovskaya *et al.*, 2009], так и других научных групп [Cao *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2013]. Поскольку N-конец 4D5scFv участвует в формировании антиген-распознающего участка, при создании более сложных конструкций для связи с другими модулями используют его C-конец [Deyev *et al.*, 2003, Willuda *et al.*, 2001].

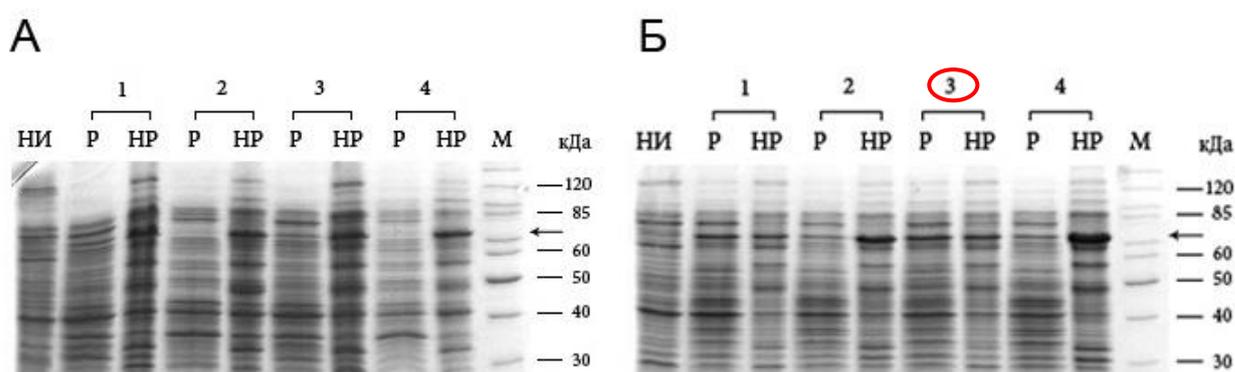
В качестве токсического (эффektorного) модуля 4D5scFv-PE40 нами использован фрагмент экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* (а.о. 252-612), лишенный собственного рецептор-узнающего домена I, далее обозначаемый PE40. Токсический эффект PE40 обусловлен ингибированием биосинтеза белка в клетке за счет АДФ-рибозилирования эукариотического фактора элонгации трансляции 2 (eEF2). В фрагменте PE40 C-концевая последовательность REDL была заменена на последовательность KDEL для повышения эффективности внутриклеточного транспорта PE40 [Chaudhary *et al.*, 1990, Seetharam *et al.*, 1991].

Фрагмент PE40 присоединен к C-концу антитела 4D5scFv через гибкий гидрофильный 16-аминокислотный линкер из шарнирной области мышинового иммуноглобулина G (hinge-подобный линкер) [Deyev *et al.*, 2003]. Этот линкер обеспечивает расположение соединяемых им участков белковой молекулы на расстоянии 2,5–2,7 нм, что позволяет двум модулям иммунотоксина, 4D5scFv и PE40, не испытывать стерических затруднений и сохранять свои функциональные свойства. Для очистки рекомбинантного иммунотоксина методом металл-хелатной аффинной хроматографии и его дальнейшей иммунодетекции на оба конца молекулы введены гексагистидиновые последовательности.

### Экспрессия и очистка 4D5scFv-PE40

Рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40 был наработан в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидой pSD-4D5scFv-PE40, содержащей ген 4D5scFv-PE40 под контролем *lac*-промотора. Клетки данного штамма дефицитны по протеазам Lon и OmpT, что позволяет нарабатывать рекомбинантные белки в больших количествах.

В результате подбора условий индукции экспрессии было установлено, что целевой белок синтезировался трансформантами в наибольшем количестве в растворимой форме при индукции добавлением 0,5 мМ ИПТГ при плотности культуры 0,6 ОЕ и последующей инкубации в течение 12 часов при +28°C (рис. 20).



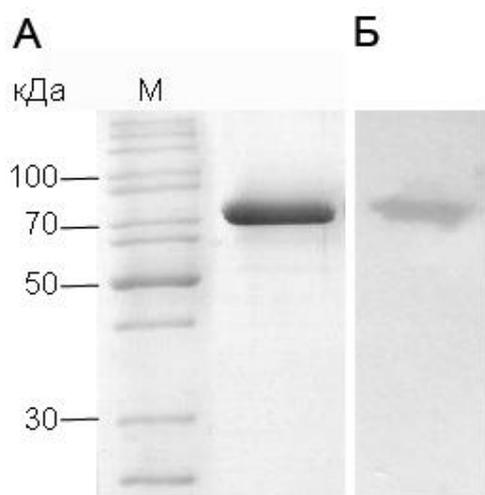
**Рисунок 20.** Подбор условий экспрессии 4D5scFv-PE40.

Результаты электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях белков лизата клеток *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированных pSD-4D5scFv-PE40, до индукции (НИ) и фракций растворимых (P) и нерастворимых (НР) белков лизата тех же клеток после индукции экспрессии при +37°C (А) или +28°C (Б). Варианты индукции обозначены цифрами, оптимальный вариант отмечен красным кружком:

- 1 – 0,1 мМ ИПТГ при  $OD_{600} \sim 0,1$  ОЕ в течение 4 ч;
- 2 – 1 мМ ИПТГ при  $OD_{600} \sim 0,6$  ОЕ в течение 4 ч;
- 3 – 0,5 мМ ИПТГ при  $OD_{600} \sim 0,6$  ОЕ в течение 12 ч;
- 4 – 1 мМ ИПТГ при  $OD_{600} \sim 1$  ОЕ в течение 12 ч.

М – маркер молекулярных масс. Стрелкой указана полоса целевого белка (71 кДа).

Использование для очистки рекомбинантного белка последовательно методов металл-хелатной аффинной хроматографии и гель-фильтрации позволило получить гомогенный препарат иммунотоксина 4D5scFv-PE40 с чистотой более 95%. Выход очищенного белка составил около 12 мг с литра культуры. Методом электрофореза в ПААГ показано, что масса полученного белка соответствует расчетной (71 кДа, рис. 20, 21А). Аутентичность полученного рекомбинантного иммунотоксина подтверждена методом вестерн-блот анализа с использованием анти-гистидиновых антител (рис. 21Б).



**Рисунок 21.** Препарат рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 после очистки последовательно методами металл-хелатной аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Показаны результаты электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях (А) и вестерн-блот анализа с использованием анти-гистидиновых антител (Б) очищенной фракции белка.

#### *Оценка противоопухолевого эффекта 4D5scFv-PE40*

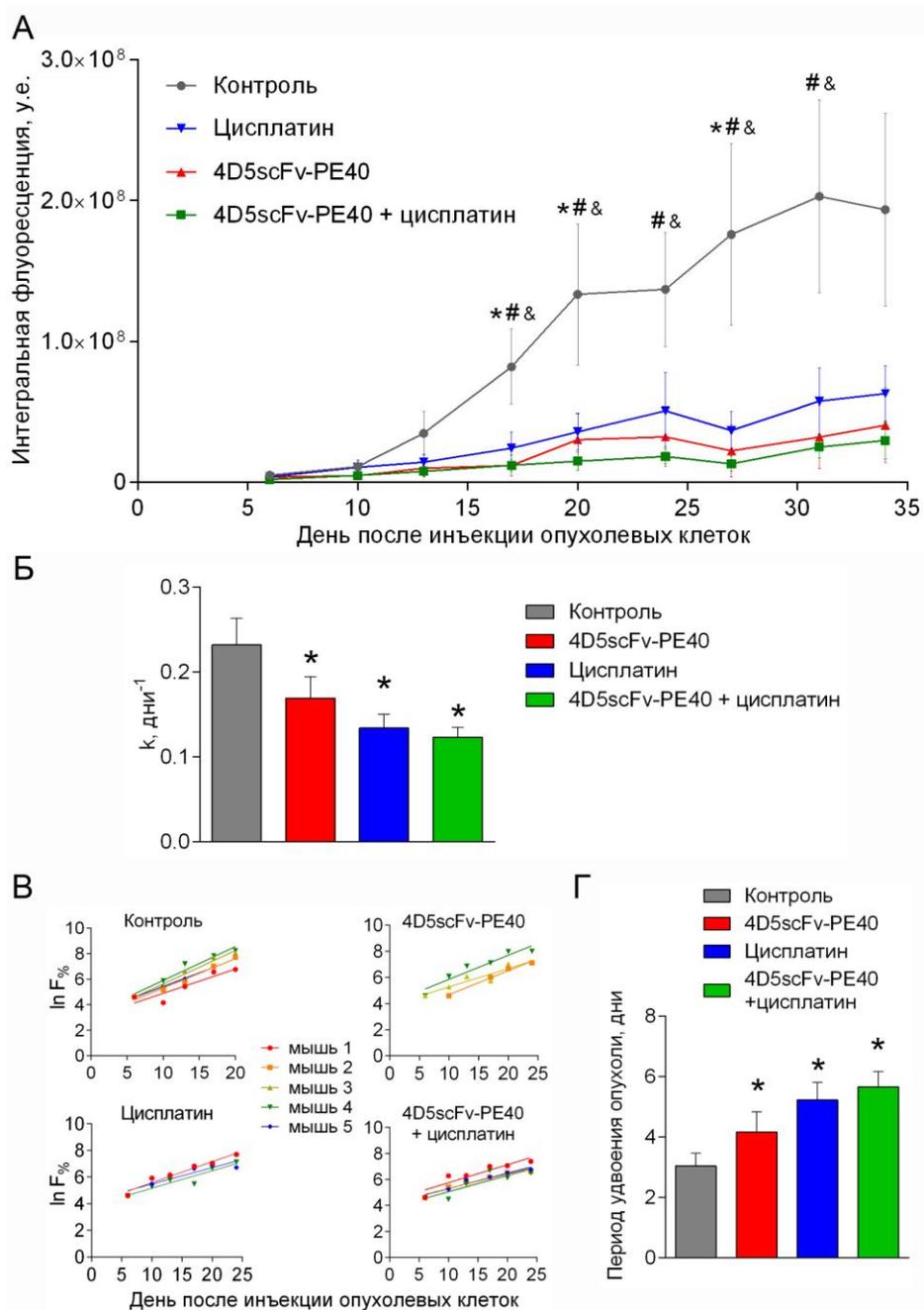
В ходе флуоресцентного имиджинга с использованием полученной флуоресцирующей модели HER2-гиперэкспрессирующей опухоли нами был выявлен выраженный противоопухолевый эффект созданного иммунотоксина, сравнимый с эффектом цисплатина (рис. 22А). Для опухолей как контрольной, так и опытных групп наблюдался экспоненциальный характер начальной стадии роста (до 20 дня после инъекции опухолевых клеток в случае контрольной группы и до 24 дня – в случае опытных групп) (рис. 22А, В). Однако, на фоне терапевтического воздействия опухоли росли существенно медленнее – показано статистически достоверное снижение

коэффициента скорости роста опухоли (рис. 22Б, В) и, соответственно, увеличение периода удвоения опухоли (рис. 22Г) в опытных группах, по сравнению с контрольной. Данный эффект может объясняться сокращением пула делящихся клеток в формирующемся опухолевом узле в результате цитотоксического действия терапевтических агентов. В результате расчета коэффициентов торможения роста опухоли (ТРО) было показано, что однократная инъекция иммунотоксина вызвала торможение опухолевого роста на 85% по сравнению с контролем на 17 день после инъекции опухолевых клеток (табл. 5). Выявленный эффект сохранялся в течение последующих двух недель. Стоит отметить, что условия данного эксперимента моделировали ситуацию терапевтического воздействия на начальную стадию образования опухолевого метастаза (то есть на группу клеток, еще не сформировавших опухолевый узел). Таким образом, исследуемый иммунотоксин 4D5scFv-PE40 способен эффективно ингибировать развитие метастаза HER2-положительной карциномы яичника, что может иметь крайне важное клиническое значение, учитывая высокий метастатический потенциал опухолей данного типа. При совместном введении иммунотоксина и цисплатина в исследуемых дозах статистически значимого усиления эффекта выявлено не было (табл. 5).

**Таблица 5.**

Значения коэффициента ТРО, рассчитанные по данным интегральной интенсивности флуоресценции на 17 день после перевивки опухолевых клеток

<b>Опытная группа</b>	<b>ТРО, %</b>
4D5scFv-PE40	85
Цисплатин	70
4D5scFv-PE40 + цисплатин	85



**Рисунок 22.** Анализ роста опухолей в различных группах животных.

**А** – кривые роста опухоли; \*, #, & – статистически значимое различие между контрольной и опытной группами: цисплатин, иммунотоксин или их сочетание, соответственно,  $p < 0,05$  (критерий Даннета,  $n=4-5$ );

**Б** – усредненные значения коэффициента скорости роста опухоли ( $k$ ), \* –  $p < 0,01$ , сравнение с контролем по критерию Даннета,  $n=4-5$ .

**В** – линеаризации экспоненциальной фазы роста опухолей с последующей линейной аппроксимацией ( $F\%$  – значение интегральной флуоресценции в процентах от начального значения);

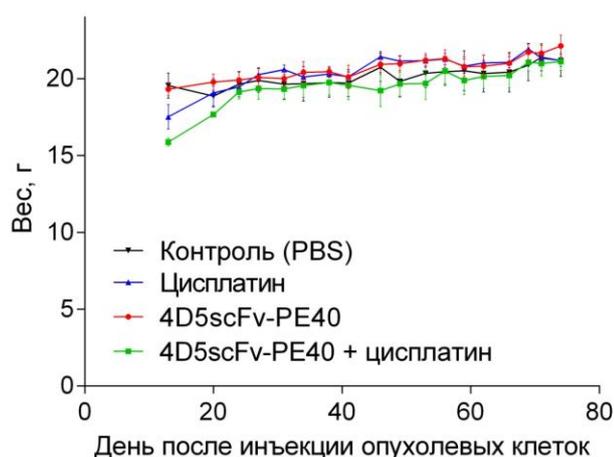
**Г** – усредненные значения периода удвоения опухоли, \* –  $p < 0,01$ , сравнение с контролем по критерию Даннета,  $n=4-5$ .

Планки погрешностей представлены стандартной ошибкой среднего.

Помимо эффективности действия, важной характеристикой разрабатываемого агента при исследовании *in vivo* является его системная токсичность. В качестве косвенного показателя общей токсичности часто используется динамика веса животных (скорость роста). В ходе эксперимента нами не было выявлено отставания в росте животных опытных групп, по сравнению с контрольной (рис. 23). Таким образом, иммунотоксин 4D5scFv-PE40 в используемой дозе не оказывал выраженного острого токсического эффекта на организм животных, используемых нами для создания ксенографтной модели опухоли человека. Тем не менее, вопрос системной токсичности нуждается в более глубоком изучении. Основной причиной, ограничивающей применение иммунотоксинов на основе PE в высоких дозах в клинике, является гепатотоксичность [Pai-Scherf *et al.*, 1999].

Предполагают две основные причины, опосредующие гепатотоксичность:

(1) присутствие рецептора HER2 на гепатоцитах и (2) атака печени Т-лимфоцитами, вызываемая гиперпродукцией фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) печеночными клетками Купфера под действием PE [Pai-Scherf *et al.*, 1999, Schumann *et al.*, 1998]. Оба перечисленных фактора не могут быть оценены с использованием иммунодефицитных (бестимусных) животных и требуют дальнейших исследований на других животных моделях.



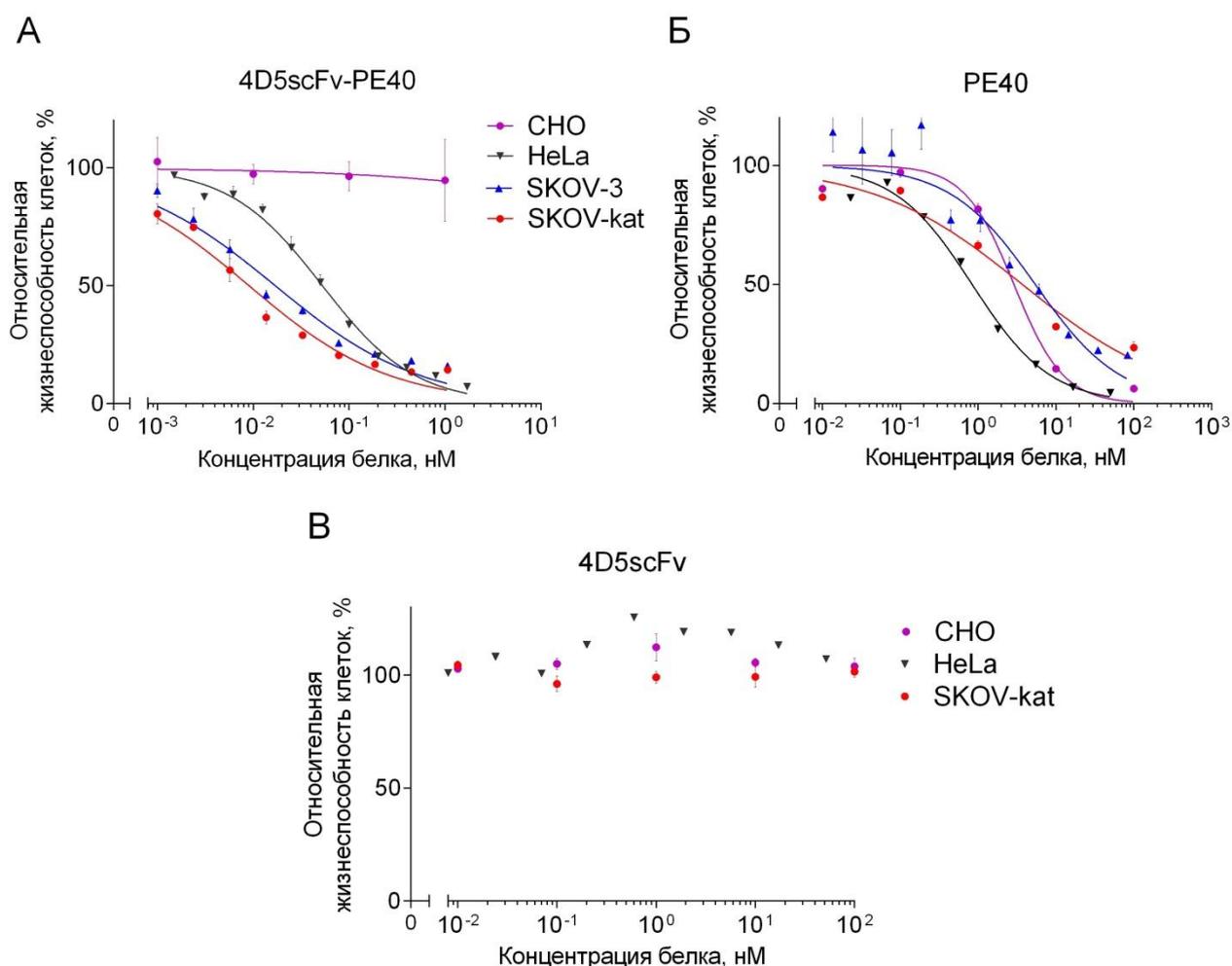
**Рисунок 23.** Динамика веса животных в разных группах. Планки погрешности представлены стандартной ошибкой среднего.

### 3.4 Исследование механизма действия иммунотоксина 4D5scFv-PE40

#### *Ингибирование жизнеспособности клеток с разным уровнем экспрессии HER2*

Анализ цитотоксического действия иммунотоксина был проведен стандартным методом МТТ с использованием линий клеток с разным уровнем экспрессии рецептора HER2: аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и SKOV-kat (высокий уровень экспрессии), аденокарциномы шейки матки человека HeLa (низкий уровень экспрессии), яичника китайского хомячка CHO (отсутствие экспрессии). Уровень экспрессии HER2 клетками перечисленных линий был предварительно оценен по содержанию рецептора на мембране клеток после их окраски HER2-специфичными антителами, конъюгированными с FITC (см. рис. 11).

Показано, что иммунотоксин не оказывает влияния на жизнеспособность HER2-отрицательных клеток CHO в использованном диапазоне концентраций, но значительно снижает жизнеспособность HER2-положительных клеток разных линий в пиколярных концентрациях, причем выраженность цитотоксического эффекта коррелирует с уровнем экспрессии HER2 (рис. 24А, табл. 6). Также была исследована цитотоксичность непосредственно токсического модуля иммунотоксина, PE40, и показано, что значения  $IC_{50}$  (концентрации, снижающей жизнеспособность клеток в 2 раза относительно контроля) PE40 превышают на один или несколько порядков (для разных клеточных линий) значения  $IC_{50}$  иммунотоксина (рис. 24Б, табл. 6).



**Рисунок 24.** Кривые относительной жизнеспособности HER2-положительных клеток SKOV-3, SKOV-kat и HeLa, и HER2-отрицательных клеток CHO после их инкубации в течение 72 ч с различными концентрациями 4D5scFv-PE40 (А), PE40 (Б) или 4D5scFv (В). Аппроксимация данных проведена методом нелинейной регрессии с использованием четырехпараметрической модели «доза-эффект». Планки погрешностей представлены стандартной ошибкой среднего.

Для количественной оценки специфичности цитотоксического действия иммунотоксина, обусловленной наличием в его составе направляющего модуля, был рассчитан так называемый «индекс нацеливания» (отношение  $IC_{50}$  PE40 к  $IC_{50}$  4D5scFv-PE40) (табл. 6). Существенная разница в значении данного показателя для клеток с низким (HeLa) и с высоким (SKOV-3, SKOV-kat) уровнем экспрессии HER2 свидетельствует о выраженном усилении токсичности фрагмента PE40 для HER2-гиперэкспрессирующих клеток после его объединения с HER2-специфичным антителом 4D5scFv.

Стоит отметить, что направляющий модуль 4D5scFv не оказывает влияния на жизнеспособность клеток всех используемых линий в исследуемом диапазоне концентраций (рис. 24B).

Результаты, полученные на культурах клеток, свидетельствуют о ярко выраженной специфичности токсического действия 4D5scFv-PE40 по отношению к клеткам, экспрессирующим HER2. Это предопределяет высокие значения терапевтического индекса при использовании данного иммунотоксина в качестве HER2-специфичного таргетного препарата *in vivo*.

**Таблица 6.**

Значения IC<sub>50</sub> рекомбинантных белков 4D5scFv-PE40 и PE40 для линий клеток с различным уровнем экспрессии рецептора HER2

Линия клеток	IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> , нМ		Индекс нацеливания <sup>2</sup>
	4D5scFv-PE40	PE40	
SKOV-3	<b>0,017</b> (0,011 – 0,025)	<b>6,6</b> (3,1 – 14,0)	388*
SKOV-kat	<b>0,008</b> (0,006 – 0,013)	<b>4,9</b> (1,3 – 18,4)	612*
HeLa	<b>0,053</b> (0,045– 0,061)	<b>0,8</b> (0,3 – 2,0)	15*
CHO	<b>8,7</b> (5,6 – 13,6)	<b>2,9</b> (1,8 – 4,6)	0.33

<sup>1</sup> значения IC<sub>50</sub> даны с 95% доверительным интервалом

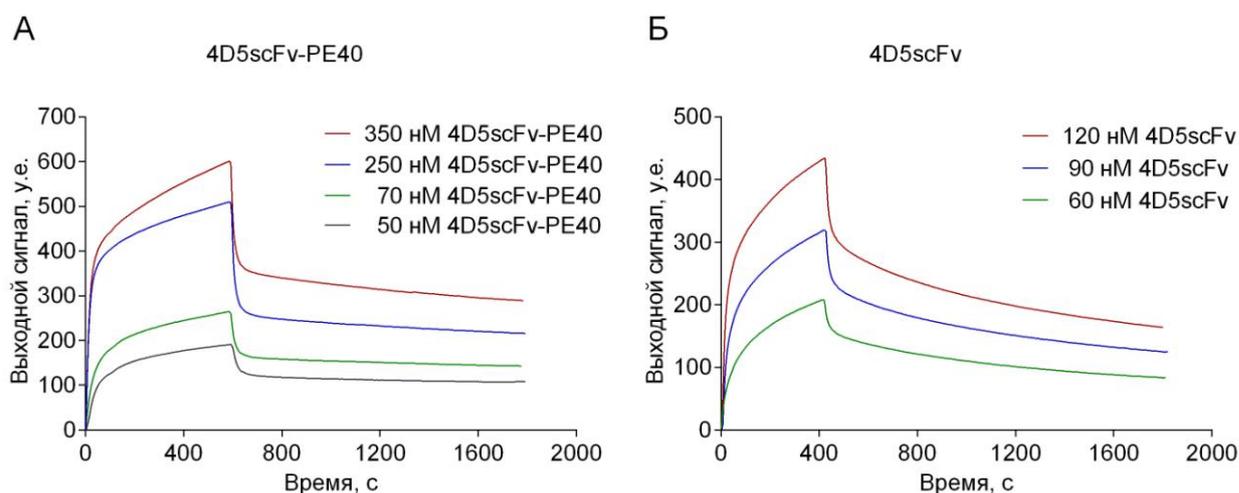
<sup>2</sup> IC<sub>50</sub> PE40/ IC<sub>50</sub> 4D5scFv-PE40

\* статистически значимое отличие от CHO, p < 0,0001 (критерий Даннета)

#### *Аффинность и специфичность взаимодействия с рецептором HER2*

Методом поверхностного плазмонного резонанса было показано, что полученный рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40 с высокой аффинностью связывается с рекомбинантным внеклеточным доменом рецептора HER2 (рис. 25A): рассчитанное значение равновесной константы

диссоциации комплекса иммунотоксина с рецептором ( $K_d$ ) составило  $6,8 \pm 1,3$  нМ ( $K_{on} = 2,29 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ;  $K_{off} = 1,56 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ ) и сравнимо с рассчитанным значением  $K_d$  комплекса антитела 4D5scFv с рецептором ( $5,2 \pm 1,0$  нМ, рис. 25Б).



**Рисунок 25.** Анализ аффинности иммунотоксина 4D5scFv-PE40. Сенсограммы взаимодействия 4D5scFv-PE40 (А) и 4D5scFv (Б) с рекомбинантным внеклеточным доменом рецептора HER2, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса при различных концентрациях белков.

Таким образом, антитело 4D5scFv в составе рекомбинантного белка сохраняет свойственную ему высокую аффинность к рецептору HER2. Приведенные результаты также согласуются с опубликованными ранее данными об аффинности антитела 4D5scFv к HER2, полученными методом радиоиммунного анализа ( $K_d = 3$  нМ) [Willuda *et al.*, 1999]. Известно, что аффинность антител в диапазоне  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  М является оптимальной для задач направленной доставки в опухоль. Для антител формата scFv показано, что при увеличении их аффинности до  $10^{-11}$  М начинает играть роль так называемый «binding site barrier» эффект, заключающийся в стабильном связывании антител с рецепторами-антигенами опухолевых клеток по периферии опухоли. Это ухудшает проникновение таких антител вглубь

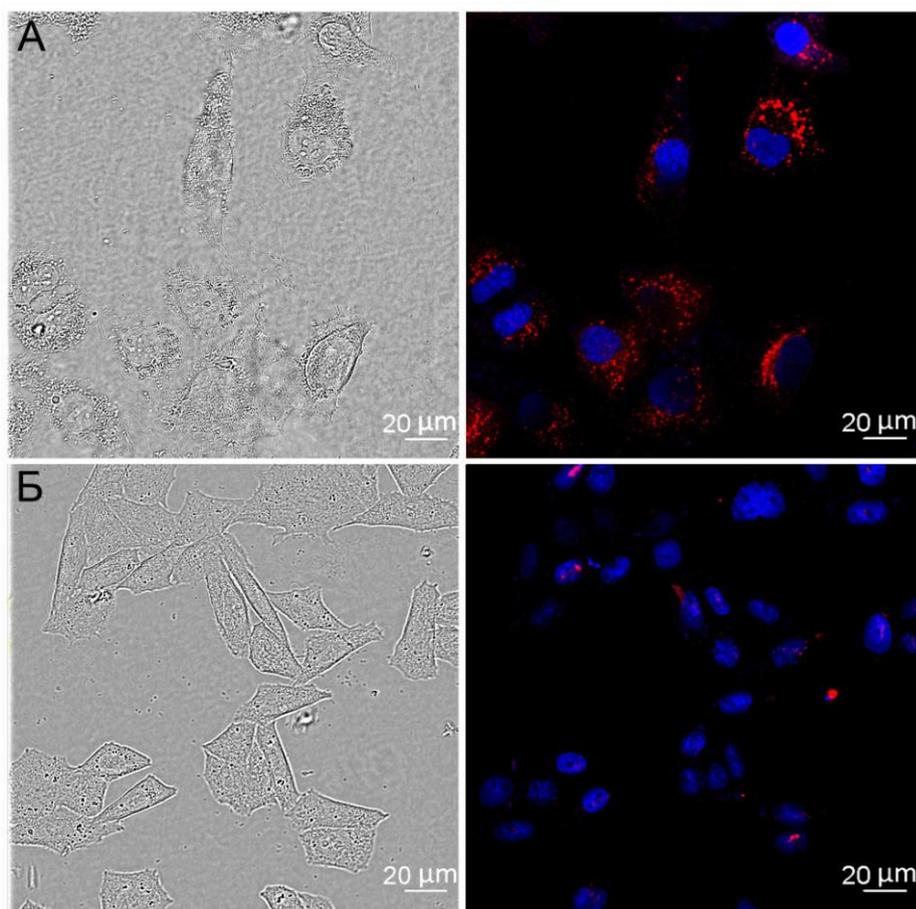
опухолевой ткани, снижая эффективность агентов на их основе [Adams *et al.*, 2001]. В случае HER2-специфичных иммунотоксинов чересчур высокая аффинность приводит также к значительному повышению системной токсичности: во-первых, за счет более эффективного связывания с нормальными клетками с низким уровнем экспрессии рецептора-мишени, во-вторых – по причине характерного для HER2 шединга внеклеточного домена (т.е. его отщепления внеклеточными металлопротеиназами – шедазами). Иммунные комплексы HER2-специфичного препарата со свободным внеклеточным доменом HER2 в кровотоке, которые эффективнее образуются в случае более аффинных препаратов, элиминируются клетками ретикуло-эндотелиальной системы, приводя, главным образом, к высокой печеночной токсичности [Cao *et al.*, 2012].

Определенная нами аффинность 4D5scFv-PE40 к рецептору HER2, лежащая в наномолярном диапазоне концентраций, позволяет рассчитывать на фармакокинетику и распределение иммунотоксина в организме, оптимальные для его использования как агента для HER2-специфичной таргетной терапии.

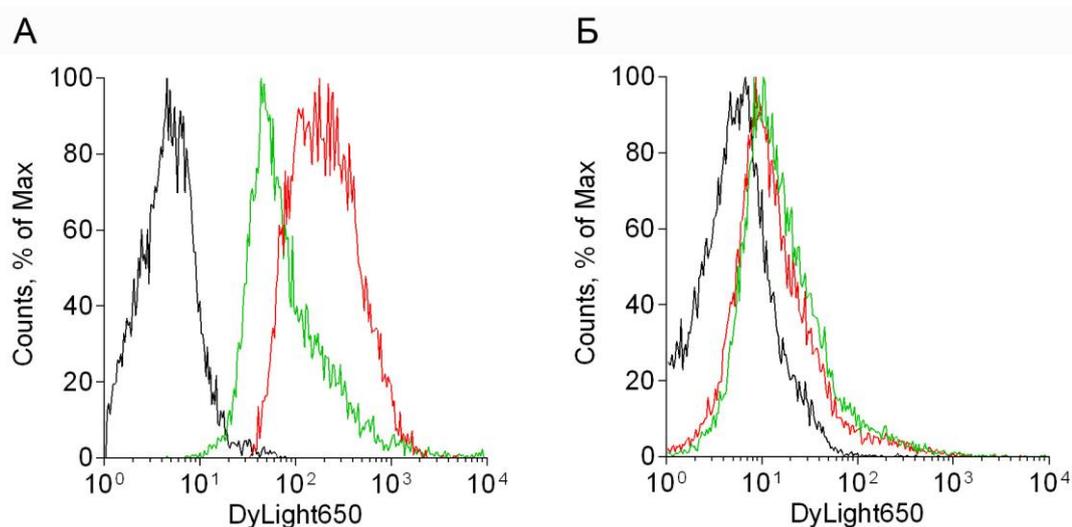
Наряду с аффинностью, необходимым свойством иммунотоксина как таргетного агента является специфичность его связывания с рецептором-мишенью. На конфокальных изображениях видно, что рекомбинантный иммунотоксин, меченный флуоресцентным красителем DyLight650, связывается и проникает в HER2-гиперэкспрессирующие клетки SKOV-3 (рис. 26А), при этом практически не окрашивая HER2-отрицательные клетки СНО (рис. 26Б).

Для подтверждения взаимодействия 4D5scFv-PE40 с рецептором HER2 на клетках был проведен анализ конкурентного ингибирования связывания методом проточной цитофлуориметрии. Показано, что в отсутствие конкурирующего агента флуоресцентно-меченный иммунотоксин эффективно связывается с клетками SKOV-3 (рис. 27А, красная линия), тогда

как в присутствии свободного антитела 4D5scFv, использованного в качестве конкурирующего агента, интенсивность флуоресценции снижается в несколько раз (рис. 27А, зеленая линия). Для HER2-отрицательных клеток СНО показан незначительный уровень неспецифического связывания иммунотоксина (рис. 27Б).



**Рисунок 26.** Анализ связывания 4D5scFv-PE40 с клетками. Конфокальная микроскопия HER2-гиперэкспрессирующих клеток SKOV-3 (А) и HER2-отрицательных клеток СНО (Б) после их инкубации в течение 1 ч при +37°C с иммунотоксином 4D5scFv-PE40, меченным DyLight650 (красный канал:  $\lambda_{ex}$  635 нм,  $\lambda_{em}$  643–735 нм). Ядра клеток окрашены DAPI (синий канал:  $\lambda_{ex}$  405 нм,  $\lambda_{em}$  421–485 нм). Представлены: изображения в проходящем свете (слева) и наложенные флуоресцентные изображения в красном и синем каналах (справа).



**Рисунок 27.** Анализ конкурентного ингибирования связывания 4D5scFv-PE40 с рецептором HER2 методом проточной цитофлуориметрии. Представлены распределения клеток SKOV-3 (А) и CHO (Б) по интенсивности флуоресценции в контрольном образце (автофлуоресценция, черная линия) и после их инкубации в течение 1 ч при +37°C с иммунотоксином 4D5scFv-PE40, меченным DyLight650: в отсутствие (красная линия) или в присутствии (зеленая линия) конкурирующего агента 4D5scFv, эквимольно ( $\lambda_{ex}$  635 нм,  $\lambda_{em}$  653–669 нм).

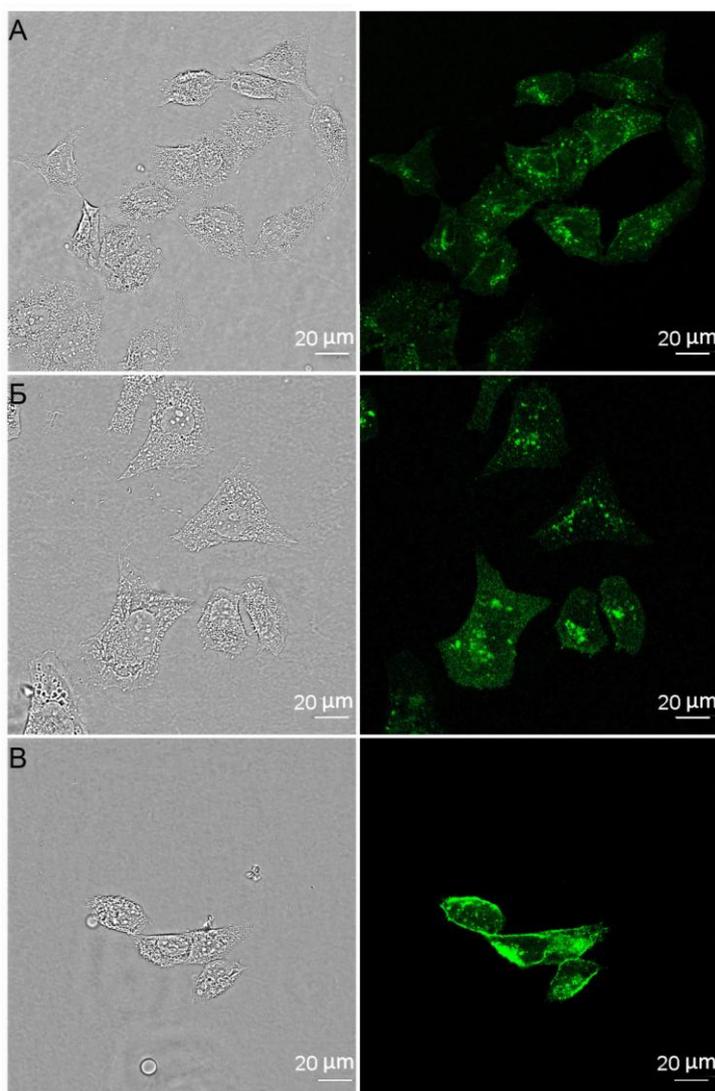
Таким образом, антитело 4D5scFv в составе рекомбинантного иммунотоксина полностью сохраняет свою функциональную активность, обеспечивая адресную доставку фрагмента PE к HER2-гиперэкспрессирующим клеткам за счет эффективного и избирательного связывания с рецептором HER2 на клетках-мишенях.

#### *Механизм интернализации 4D5scFv-PE40*

Поскольку цитотоксический эффект иммунотоксинов на основе PE реализуется в цитоплазме клетки, помимо аффинного и избирательного связывания с поверхностным рецептором-мишенью необходимым критерием их эффективности является последующий эндоцитоз [Pastan *et al.*, 2007, Weldon *et al.*, 2011]. Для установления механизма интернализации 4D5scFv-PE40 после связывания с рецептором HER2 был проведен ингибиторный анализ путей эндоцитоза. В качестве ингибитора клатрин-опосредованного

эндоцитоза был использован хлорпромазин, который предотвращает формирование клатриновых везикул на мембране за счет удержания клатрина и адаптерного белка AP-2 на мембране эндосом и нарушения их возврата на мембрану [Wang *et al.*, 1993]. Для ингибирования эндоцитоза, опосредованного кавеолами, использовали филипин – полиеновый антибиотик, связывающий холестерин и тем самым нарушающий формирование кавеол [Rothberg *et al.*, 1992, Rothberg *et al.*, 1990]. На полученных конфокальных изображениях клеток SKOV-3 после инкубации с иммунотоксином, меченным FITC, видно распределение флуоресцентного сигнала внутри клетки как в отсутствие ингибиторов эндоцитоза (рис. 28А), так и в присутствии филипина (рис. 28Б). В то же время, в присутствии хлорпромазина клетки приобретают выраженную окраску по мембране, что свидетельствует о замедлении процесса интернализации (рис. 28В). Таким образом, очевидно, что 4D5scFv-PE40 проникает в клетку путем клатрин-опосредованной интернализации.

Одной из особенностей рецептора HER2, обуславливающей его роль в усилении передачи сигнала, является низкая эффективность интернализации как самого HER2, так и HER2-содержащих гетеродимеров с другими рецепторами этого семейства [Harari *et al.*, 2000, Sorkin *et al.*, 1993]. Также известно, что не все комплексы рецептора с HER2-специфичными моноклональными антителами или искусственными лигандами интернализуются [Rubin *et al.*, 2001], что может зависеть от ряда факторов, в частности, от биологии клетки-мишени [Hashizume *et al.*, 2008] и валентности лиганда [Guillemard *et al.*, 2005, Vaidyanath *et al.*, 2011]. В связи с этим, вопрос интернализации HER2-специфичного терапевтического агента требует выяснения в каждом конкретном случае. Полученные нами результаты позволяют заключить, что антитело 4D5scFv в конструкции иммунотоксина обеспечивает его попадание в клетку в результате клатрин-опосредованного эндоцитоза его комплекса с рецептором HER2.



**Рисунок 28.** Исследование интернализации 4D5scFv-PE40. Конфокальная микроскопия HER2-гиперэкспрессирующих клеток SKOV-3 после их инкубации в течение 2 ч при 37°C с иммунотоксином 4D5scFv-PE40, меченным FITC (зеленый), в отсутствие ингибиторов эндоцитоза (А) и в присутствии филипина (Б) или хлорпромазина (В). Представлены: изображения клеток в проходящем свете (слева) и изображения в зеленом канале ( $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  505–600 нм, справа).

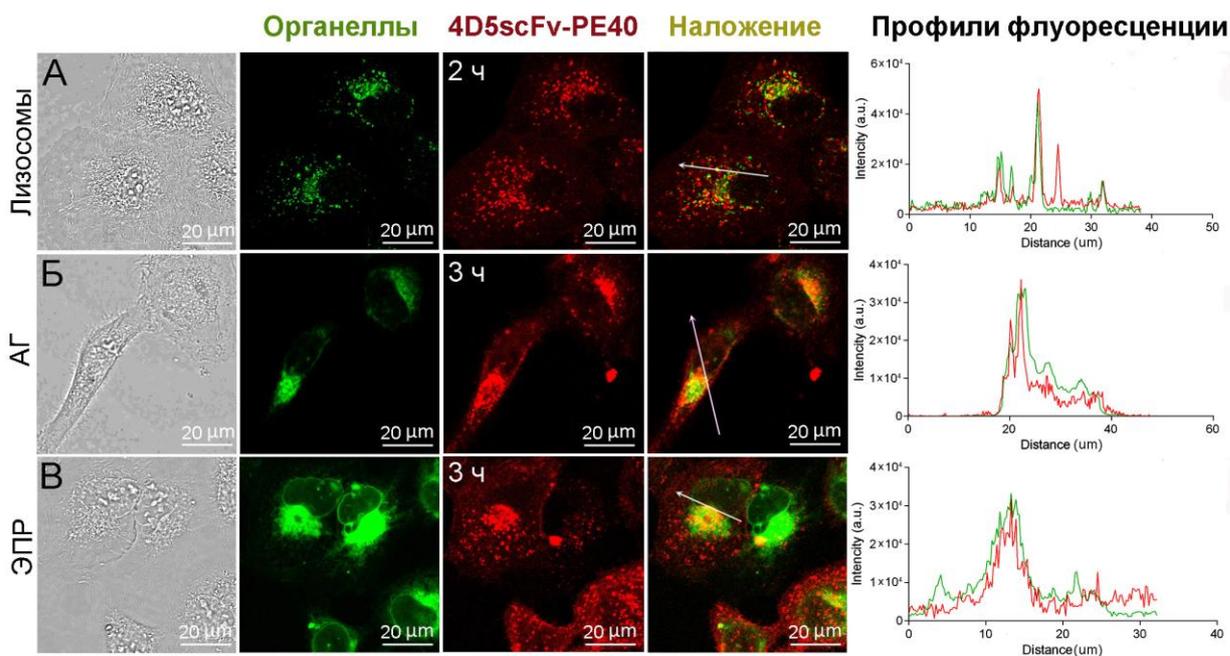
#### *Внутриклеточная локализация 4D5scFv-PE40*

Судьба PE дикого типа после попадания в клетку на настоящий момент достаточно хорошо изучена. Известно, что после рецептор-опосредованной интернализации молекула PE проходит в клетке довольно сложный и многостадийный ретроградный транспортный путь от эндосом, через аппарат Гольджи в ЭПР, с последующим выходом в цитоплазму, где каталитический домен токсина инактивирует фактор элонгации трансляции eEF2 (см. п. 1.3.3). В то же время показано, что нарушения на разных этапах этого транспортного пути могут значительно снизить цитотоксический эффект PE

[Weldon *et al.*, 2011]. Такие нарушения могут быть обусловлены, вероятно, как фенотипом конкретных клеток-мишеней, так и модификацией молекулы токсина – в частности, его объединением с направляющим белком в составе иммунотоксина.

Анализ внутриклеточного распределения иммунотоксина 4D5scFv-PE40, меченного DyLight650, проводили методом конфокальной микроскопии после окраски клеток флуоресцентными красителями органелл. Результаты свидетельствуют о локализации иммунотоксина в лизосомах через 2 ч инкубации (рис. 29А), в то время как через более длительный период инкубации (3 ч) иммунотоксин был обнаружен в аппарате Гольджи (рис. 29Б) и в ЭПР (рис. 29В). О локализации иммунотоксина в органеллах судили по совпадению пиков в профилях интенсивности флуоресценции в двух анализируемых каналах: зеленом (красители органелл) и красном (4D5scFv-PE40, меченный DyLight650). Мы предполагаем, что интернализовавшийся иммунотоксин частично деградирует в лизосомах, однако часть молекул проходит продуктивный путь транспорта и попадает в ЭПР. Очевидно, это обусловлено наличием последовательности KDEL на С-конце молекулы иммунотоксина, играющей ключевую роль в ретроградном транспорте белков из аппарата Гольджи в ЭПР [Chaudhary *et al.*, 1990, Seetharam *et al.*, 1991]. Далее, с высокой долей вероятности, иммунотоксин (или его С-концевой фрагмент) достигает цитоплазмы, используя систему ЭПР-ассоциированной деградации белков, что было ранее показано для С-концевого фрагмента PE дикого типа [Koopmann *et al.*, 2000].

Полученные нами данные позволяют сделать вывод об отсутствии влияния направляющего модуля 4D5scFv на транспортный путь фрагмента PE в клетке.



**Рисунок 29.** Анализ внутриклеточной локализации 4D5scFv-PE40. Конфокальная микроскопия HER2-гиперэкспрессирующих клеток SKOV-3 после их инкубации в течение различного времени при 37°C с иммунотоксином 4D5scFv-PE40, меченным DyLight650 (красный), и последующей окраски флуоресцентными маркерами органелл (зеленый): лизосом (А), аппарата Гольджи (Б) и ЭПР (В). Красный канал:  $\lambda_{ex}$  635 нм,  $\lambda_{em}$  643–735 нм, зеленый канал:  $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  509–566 нм.

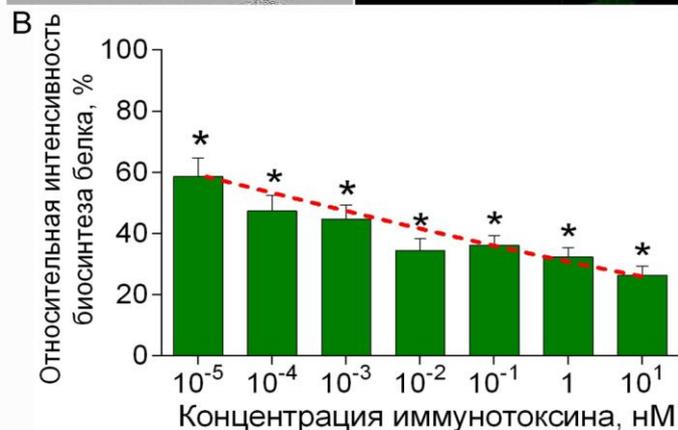
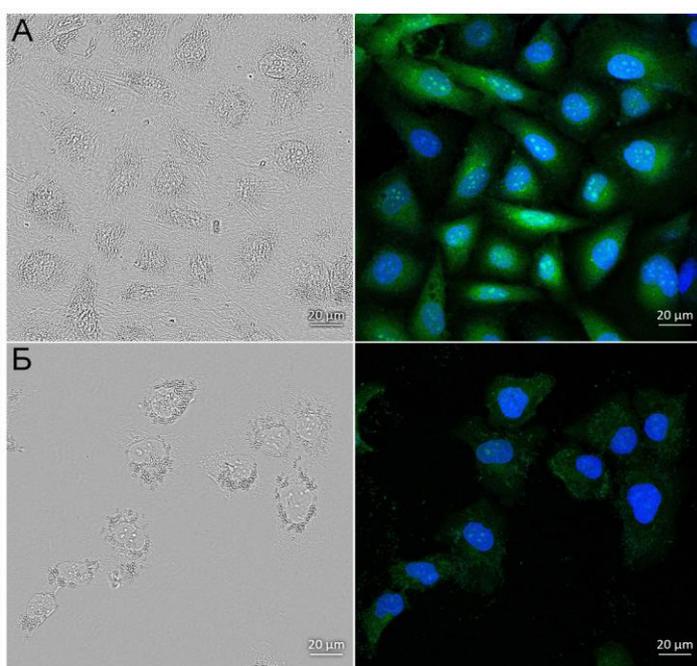
Представлены: изображения клеток в проходящем свете (первый столбец), в зеленом и красном каналах (второй и третий столбцы, соответственно), наложенные изображения в двух каналах (четвертый столбец), профили интенсивности флуоресценции в двух каналах в направлении стрелки (пятый столбец).

### *Ингибирование биосинтеза белка в клетках*

Для выяснения механизма показанного цитотоксического действия иммунотоксина был проведен анализ интенсивности биосинтеза белка в клетках SKOV-3 после суточной инкубации с различными концентрациями 4D5scFv-PE40. Для этого была использована технология Click-iT АНА, основанная на встраивании аналога метионина (азидогомоаланина) в полипептидные цепи в процессе их синтеза в клетках, инкубируемых в безметиониновой среде, с последующим специфичным мечением этого аналога флуоресцентным красителем, в данном случае – алкиновым производным зеленого красителя Alexa Fluor 488 (так называемая «click-

реакция» азид-алкинового циклоприсоединения). Интенсивность флуоресцентного сигнала в цитоплазме клетки при этом коррелирует с количеством встроенного азидогомоаланина и, следовательно, с интенсивностью биосинтеза белка.

На конфокальных изображениях (рис. 30) видно, что в клетках, обработанных иммунотоксином в концентрации 1 нМ, биосинтез белка значительно менее интенсивный (рис. 30Б) по сравнению с контролем (рис. 30А). Показано также, что эффект ингибирования биосинтеза белка под действием 4D5scFv-PE40 имеет дозозависимый характер со значением  $IC_{50}$  0,05 пМ (рис. 30В).



**Рисунок 30.** Анализ ингибирования биосинтеза белка под действием 4D5scFv-PE40 методом Click-iT АНА.

А, Б – конфокальная микроскопия клеток SKOV-3 в контроле и после их инкубации с 1 нМ иммунотоксина в течение 24 ч, соответственно.

Представлены: изображения в проходящем свете (слева) и флуоресцентные изображения (справа).

Интенсивность флуоресценции в зеленом канале ( $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  507–585 нм) коррелирует с интенсивностью биосинтеза белка. Ядра окрашены Hoechst33342 (синий канал:  $\lambda_{ex}$  750 нм,  $\lambda_{em}$  415–498 нм).

В – относительная интенсивность биосинтеза белка в клетках SKOV-3 при различных концентрациях иммунотоксина,

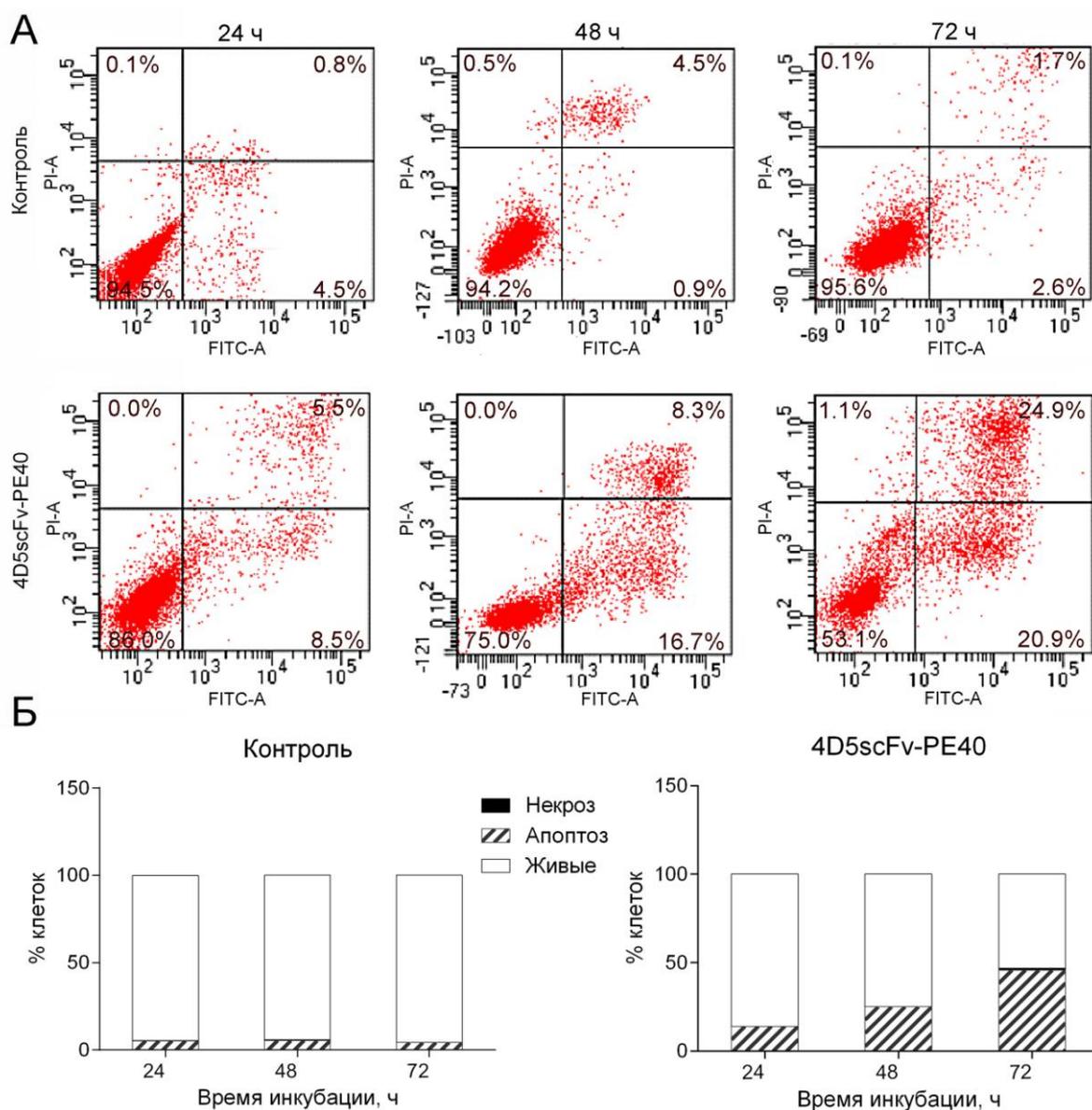
\* –  $p < 0,0001$ , сравнение с контролем по критерию Даннета ( $n > 20$ ). Красная пунктирная линия – аппроксимация данных методом нелинейной регрессии с использованием четырехпараметрической модели «доза-эффект».

Таким образом, цитотоксический эффект иммунотоксина объясняется блокадой биосинтеза белка, что соответствует механизму цитотоксичности PE дикого типа и, следовательно, обусловлено действием токсического модуля иммунотоксина (PE40). Полученные результаты также свидетельствуют о продуктивном транспорте иммунотоксина в клетках SKOV-3, заканчивающемся выходом в цитоплазму функционально активного фрагмента PE.

### *Механизм клеточной гибели*

В перспективе клинического использования противоопухолевого агента отдельным вопросом является индуцируемый им тип гибели опухолевых клеток. Благоприятным вариантом представляется апоптоз. В отличие от некроза, апоптоз не сопровождается воспалительной реакцией, но, в то же время, может приводить к повышению иммуногенности опухоли и индуцировать противоопухолевый иммунный ответ [Melcher *et al.*, 1999].

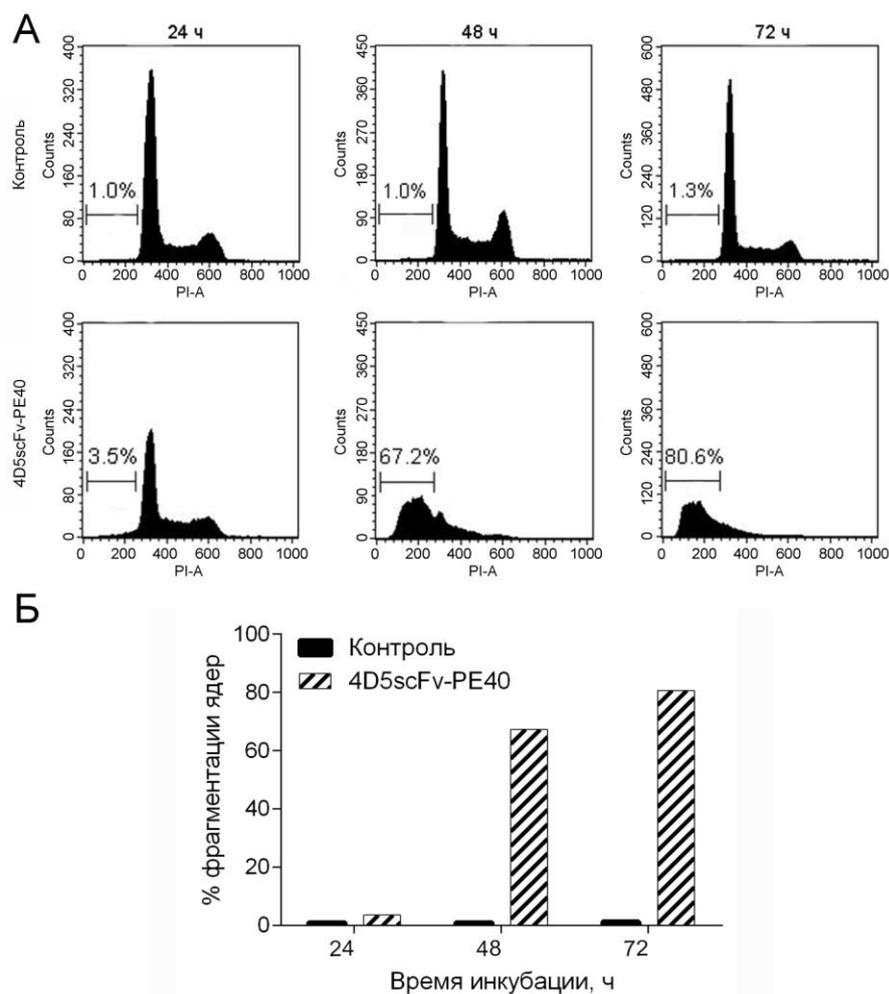
Для определения типа гибели клеток под действием иммунотоксина 4D5scFv-PE40 был проведен анализ экстернализации фосфатидилсерина – одного из ранних признаков апоптоза, появляющегося в результате потери асимметричности распределения липидов плазмалеммы [Chaurio *et al.*, 2009, Segawa *et al.*, 2015]. Для этого клетки были окрашены смесью аннексина V-FITC (AnxV – белок, специфично связывающийся с фосфатидилсерином) и йодида пропидия (PI – краситель ДНК, проникающий только в клетки с нарушенной мембраной). Методом проточной цитофлуориметрии была обнаружена выраженная экстернализация фосфатидилсерина (рис. 31А, Б): через 72 ч инкубации с иммунотоксином доля апоптотических клеток, т.е. сумма клеток, находящихся в раннем (PI<sup>-</sup>AnxV<sup>+</sup>) и позднем (PI<sup>+</sup>AnxV<sup>+</sup>) апоптозе, составила около 50%.



**Рисунок 31.** Анализ гибели клеток SKOV-3 после их инкубации с 50 нМ 4D5scFv-PE40 в течение различного времени. **А** – цитофлуориметрический анализ экстернализации фосфатидилсерина после окраски клеток AnxV-FITC/PI (доля клеток в каждом квадранте указана в процентах), FITC:  $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  515–545 нм, PI:  $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  564–606 нм; **Б** – распределение клеток по типу гибели.

Гибель клеток по пути апоптоза была также подтверждена в ходе анализа клеточного цикла SKOV-3 методом проточной цитофлуориметрии после выделения и окраски ядер клеток PI. Появление и увеличение количества событий в регионе subG1 свидетельствует о фрагментации ядер (гипоплоидные ядра), что сопровождается поздние стадии апоптоза.

Количество фрагментированных ядер достигало 80% от общего числа после 72 ч инкубации клеток с 4D5scFv-PE40 (рис. 32А, Б).



**Рисунок 32.** Анализ гибели клеток SKOV-3 после их инкубации с 50 нМ 4D5scFv-PE40 в течение различного времени. **А** – цитофлуориметрический анализ фрагментации ядер после их выделения и окраски PI (доля ядер в регионе subG1 указана в процентах),  $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  564–606 нм; **Б** – доля фрагментированных ядер.

Представленные результаты позволяют полагать, что показанный цитотоксический эффект 4D5scFv-PE40 в конечном счете выражается в запуске апоптоза в клетках-мишенях. Гибель клеток по пути апоптоза была показана для ряда иммунотоксинов на основе PE с разной специфичностью действия [Decker *et al.*, 2004, Keppler-Hafkemeyer *et al.*, 1998, Keppler-Hafkemeyer *et al.*, 2000, Ribbert *et al.*, 2010, Risberg *et al.*, 2009, Staudinger *et*

*al.*, 2014, *Zhu et al.*, 2013], однако, молекулярные механизмы, связывающие блокаду биосинтеза белка и запуск апоптоза, до конца не установлены (см. п.1.3.3).

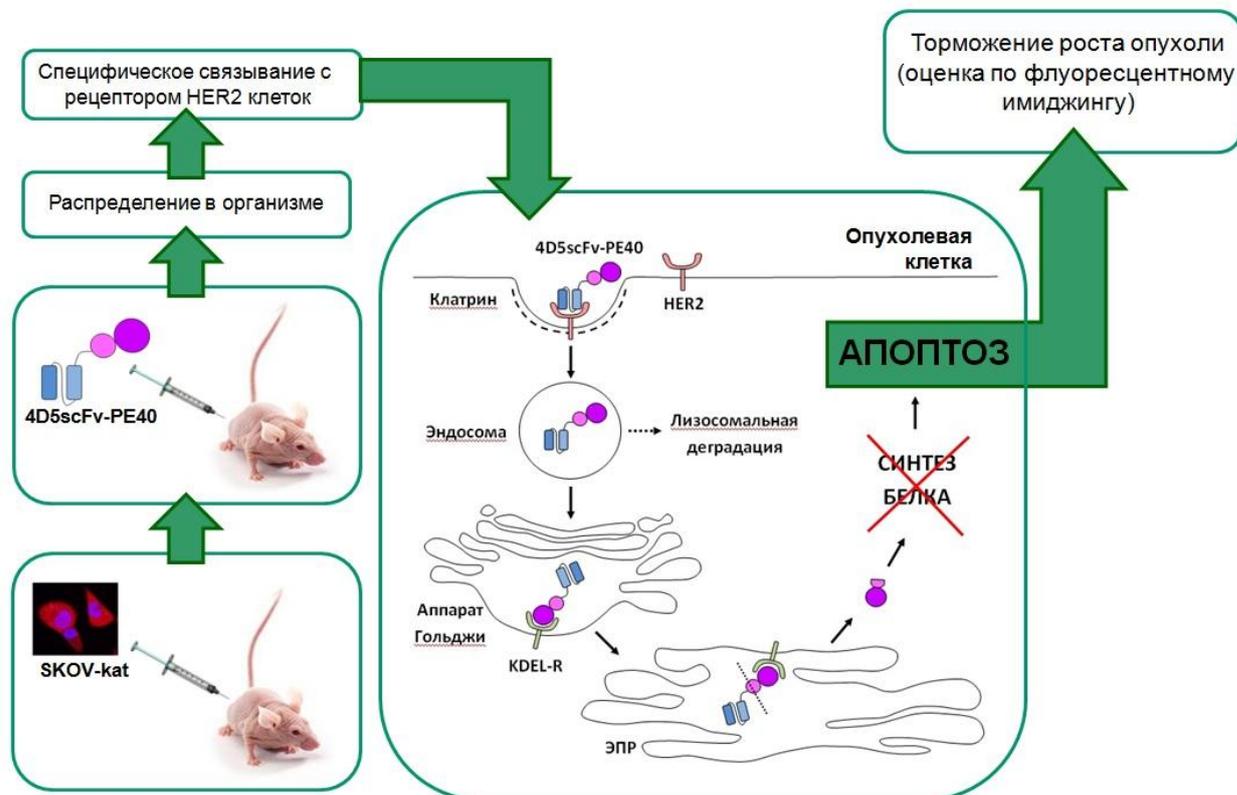
Интересно отметить, что, в соответствии с полученными нами результатами, в клетках SKOV-3 ингибирование биосинтеза белка довольно существенно разобщено во времени с появлением признаков раннего апоптоза (экстернализация фосфатидилсерина). Через 24 ч инкубации с иммунотоксином биосинтез белка значительно ингибирован в широком диапазоне концентраций 4D5scFv-PE40 (рис. 30В), при этом доля находящихся в апоптозе клеток невысока (рис. 31, 32). Вероятно, это свидетельствует о нарушении процесса запуска апоптоза в клетках SKOV-3, что, в частности, может быть связано с известной для этих клеток мутацией гена белка p53, обуславливающей отсутствие в клетке его транскриптов и самого белка [*Yaginuma et al.*, 1992]. Можно также предположить вовлечение каких-либо программ выживания, обусловленных повышенной экспрессией анти-апоптотических белков.

Таким образом, в результате экспериментов на культуре клеток показана высокая эффективность направленного цитотоксического действия HER2-специфичного 4D5scFv-PE40 на основе антитела 4D5scFv и фрагмента PE, что определяется совокупностью факторов: (1) специфичным и аффинным связыванием иммунотоксина с рецептором HER2 на поверхности клетки, (2) эффективной интернализацией комплекса «рецептор-иммунотоксин» путем клатрин-зависимого эндоцитоза, (3) продуктивным внутриклеточным транспортом иммунотоксина, обеспечивающим доставку функционально-активного фрагмента PE в цитоплазму, (4) апоптозом клеток-мишеней в результате блокады биосинтеза белка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученная ксенографтная модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли, флуоресцирующая в области «окна прозрачности» биологических тканей, представляется высокоэффективным инструментом для решения задач экспериментальной онкологии. Использование данной модели позволяет прижизненно проводить мониторинг роста опухоли в организме одного и того же животного с помощью неинвазивного метода поверхностного флуоресцентного имиджинга. Показанная высокая информативность такого подхода в отношении визуализации опухолевых клеток *in vivo* обеспечивает корректную оценку динамики роста опухоли, что особенно важно при исследовании противоопухолевого эффекта потенциальных терапевтических агентов. Гиперэкспрессия рецептора-мишени HER2 клетками полученной опухолевой модели открывает возможности ее использования для оценки эффективности агентов для таргетной HER2-специфичной терапии. В частности, в работе выявлен выраженный противоопухолевый эффект созданного нами HER2-специфичного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на основе HER2-специфичного антитела 4D5scFv и фрагмента псевдомонадного экзотоксина А (PE40). Объединение двух функциональных модулей, направляющего (4D5scFv) и токсического (PE40), в единую белковую молекулу обеспечило, с одной стороны, прицельную доставку иммунотоксина в HER2-экспрессирующие опухолевые клетки за счет специфичного и аффинного взаимодействия с рецептором HER2 и последующей клатрин-опосредованной интернализации, а с другой – мощный цитотоксический эффект на клетки-мишени, выражающийся в ингибировании биосинтеза белка и запуске апоптоза. Таким образом, сохранение функциональных свойств 4D5scFv и PE40 в составе рекомбинантного иммунотоксина обусловило его высокую и

селективную токсичность в отношении клеток, гиперэкспрессирующих HER2, что на уровне организма животного *in vivo* выразилось в торможении роста модельной опухоли (рис. 33).



**Рисунок 33.** Предполагаемый механизм действия HER2-специфичного иммунотоксина 4D5scFv-PE40.

## ВЫВОДЫ

1. Создана ксенографтная модель аденокарциномы яичника человека на иммунодефицитном животном, характеризующаяся гиперэкспрессией рецептора HER2 и стабильной экспрессией дальнекрасного флуоресцентного белка Katushka, спектр эмиссии которого лежит в области терапевтического окна прозрачности биологических тканей.
2. Показана высокая информативность созданной модели для прижизненной визуализации опухоли в организме животного неинвазивным методом флуоресцентного имиджинга, продемонстрированы возможности ее использования для высокоэффективной оценки действия противоопухолевых агентов.
3. С использованием полученной флуоресцирующей модели установлен выраженный противоопухолевый эффект созданного рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на основе псевдомонадного экзотоксина А и HER2-специфичного антитела формата scFv.
4. Установлен механизм избирательного цитотоксического действия иммунотоксина 4D5scFv-PE40, заключающийся в аффинном и специфичном связывании иммунотоксина с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток, клатрин-опосредованной интернализации и распределении в компартментах клетки, характерном для молекулы псевдомонадного экзотоксина А дикого типа, ингибировании биосинтеза белка и последующей гибели клеток по пути апоптоза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Льюин Б. и др. Клетки. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 951 с.
2. Миронов А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
3. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 478 с.
4. Тучин В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2013. – 812 с.
5. Хабриев Р.У. и др. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
6. Adams G.P., Schier R., McCall A.M., Simmons H.H., Horak E.M., Alpaugh R.K., Marks J.D., Weiner L.M. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules // *Cancer Res.* 2001. V.61 (12). P.4750-4755.
7. Al-Lazikani B., Banerji U., Workman P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era // *Nat Biotechnol.* 2012. V.30 (7). P.679-692.
8. Alewine C., Hassan R., Pastan I. Advances in anticancer immunotoxin therapy // *Oncologist.* 2015. V.20 (2). P.176-185.
9. Andersson Y., Juell S., Fodstad O. Downregulation of the antiapoptotic MCL-1 protein and apoptosis in MA-11 breast cancer cells induced by an anti-epidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin a immunotoxin // *Int J Cancer.* 2004. V.112 (3). P.475-483.
10. Antignani A., Fitzgerald D. Immunotoxins: the role of the toxin // *Toxins.* 2013. V.5 (8). P.1486-1502.
11. Arribas J., Baselga J., Pedersen K., Parra-Palau J.L. p95HER2 and breast

- cancer // *Cancer Res.* 2011. V.71 (5). P.1515-1519.
12. Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. Antitumor activity and toxicity of anti-HER2 immunoRNase scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts // *Invest New Drugs.* 2011. V.29 (1). P.22-32.
  13. Baulida J., Kraus M.H., Alimandi M., Di Fiore P.P., Carpenter G. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired // *J Biol Chem.* 1996. V.271 (9). P.5251-5257.
  14. Behdani M., Zeinali S., Karimipour M., Khanahmad H., Schoonooghe S., Aslemarz A., Seyed N., Moazami-Godarzi R., Baniahmad F., Habibi-Anbouhi M., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Muyldermans S. Development of VEGFR2-specific Nanobody Pseudomonas exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth // *N Biotechnol.* 2013. V.30 (2). P.205-209.
  15. Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat Methods.* 2006. V.3 (4). P.281-286.
  16. Benhar I., Wang Q.C., FitzGerald D., Pastan I. Pseudomonas exotoxin A mutants. Replacement of surface-exposed residues in domain III with cysteine residues that can be modified with polyethylene glycol in a site-specific manner // *J Biol Chem.* 1994. V.269 (18). P.13398-13404.
  17. Binz H.K., Amstutz P., Pluckthun A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains // *Nat Biotechnol.* 2005. V.23 (10). P.1257-1268.
  18. Bird R.E., Hardman K.D., Jacobson J.W., Johnson S., Kaufman B.M., Lee S.M., Lee T., Pope S.H., Riordan G.S., Whitlow M. Single-chain antigen-binding proteins // *Science.* 1988. V.242 (4877). P.423-426.
  19. Bjorn M.J., Manger R., Sivam G., Morgan A.C., Jr., Torok-Storb B.

- Selective elimination of breast cancer cells from human bone marrow using an antibody-Pseudomonas exotoxin A conjugate // *Cancer Res.* 1990. V.50 (18). P.5992-5996.
20. Bogner C., Dechow T., Ringshausen I., Wagner M., Oelsner M., Lutzny G., Licht T., Peschel C., Pastan I., Kreitman R.J., Decker T. Immunotoxin BL22 induces apoptosis in mantle cell lymphoma (MCL) cells dependent on Bcl-2 expression // *Br J Haematol.* 2010. V.148 (1). P.99-109.
  21. Bouvet M., Wang J., Nardin S.R., Nassirpour R., Yang M., Baranov E., Jiang P., Moossa A.R., Hoffman R.M. Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model // *Cancer Res.* 2002. V.62 (5). P.1534-1540.
  22. Brinkmann U., Mansfield E., Pastan I. Effects of BCL-2 overexpression on the sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to ricin, diphtheria and Pseudomonas toxin and immunotoxins // *Apoptosis.* 1997. V.2 (2). P.192-198.
  23. Brinkmann U., Reiter Y., Jung S.H., Lee B., Pastan I. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993. V.90 (16). P.7538-7542.
  24. Burgess A.W., Cho H.S., Eigenbrot C., Ferguson K.M., Garrett T.P., Leahy D.J., Lemmon M.A., Sliwkowski M.X., Ward C.W., Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors // *Mol Cell.* 2003. V.12 (3). P.541-552.
  25. Cao Y., Marks J.D., Huang Q., Rudnick S.I., Xiong C., Hittelman W.N., Wen X., Marks J.W., Cheung L.H., Boland K., Li C., Adams G.P., Rosenblum M.G. Single-chain antibody-based immunotoxins targeting Her2/neu: design optimization and impact of affinity on antitumor efficacy and off-target toxicity // *Mol Cancer Ther.* 2012. V.11 (1). P.143-153.
  26. Cao Y., Marks J.W., Liu Z., Cheung L.H., Hittelman W.N., Rosenblum M.G. Design optimization and characterization of Her2/neu-targeted

- immunotoxins: comparative in vitro and in vivo efficacy studies // *Oncogene*. 2014. V.33 (4). P.429-439.
27. Carlson H.J., Cotton D.W., Campbell R.E. Circularly permuted monomeric red fluorescent proteins with new termini in the beta-sheet // *Protein Sci*. 2010. V.19 (8). P.1490-1499.
  28. Carter P., Presta L., Gorman C.M., Ridgway J.B., Henner D., Wong W.L., Rowland A.M., Kotts C., Carver M.E., Shepard H.M. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992. V.89 (10). P.4285-4289.
  29. Chaudhary V.K., Jinno Y., FitzGerald D., Pastan I. Pseudomonas exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. V.87 (1). P.308-312.
  30. Chaudhary V.K., Queen C., Junghans R.P., Waldmann T.A., FitzGerald D.J., Pastan I. A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to Pseudomonas exotoxin // *Nature*. 1989. V.339 (6223). P.394-397.
  31. Chaudhuri T.R., Mountz J.M., Rogers B.E., Partridge E.E., Zinn K.R. Light-based imaging of green fluorescent protein-positive ovarian cancer xenografts during therapy // *Gynecol Oncol*. 2001. V.82 (3). P.581-589.
  32. Chaurio R.A., Janko C., Munoz L.E., Frey B., Herrmann M., Gaipf U.S. Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation // *Molecules*. 2009. V.14 (12). P.4892-4914.
  33. Chishima T., Miyagi Y., Wang X., Yamaoka H., Shimada H., Moossa A.R., Hoffman R.M. Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression // *Cancer Res*. 1997. V.57 (10). P.2042-2047.
  34. Choudhary S., Mathew M., Verma R.S. Therapeutic potential of anticancer immunotoxins // *Drug Discov Today*. 2011. V.16 (11-12). P.495-503.
  35. Chovnick A., Schneider W.P., Tso J.Y., Queen C., Chang C.N. A

- recombinant, membrane-acting immunotoxin // *Cancer Res.* 1991. V.51 (2). P.465-467.
36. Christensen J., Vonwil D., Shastri V.P. Non-Invasive In Vivo Imaging and Quantification of Tumor Growth and Metastasis in Rats Using Cells Expressing Far-Red Fluorescence Protein // *PLoS One.* 2015. V.10 (7). P.e0132725.
37. Chu J., Haynes R.D., Corbel S.Y., Li P., Gonzalez-Gonzalez E., Burg J.S., Ataie N.J., Lam A.J., Cranfill P.J., Baird M.A., Davidson M.W., Ng H.L., Garcia K.C., Contag C.H., Shen K., Blau H.M., Lin M.Z. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein // *Nat Methods.* 2014. V.11 (5). P.572-578.
38. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues // *Physiol Rev.* 2010. V.90 (3). P.1103-1163.
39. Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) // *Gene.* 1996. V.173 (1 Spec No). P.33-38.
40. Dean G.S., Pusztai L., Xu F.J., O'Briant K., DeSombre K., Conaway M., Boyer C.M., Mendelsohn J., Bast R.C., Jr. Cell surface density of p185(c-erbB-2) determines susceptibility to anti-p185(c-erbB-2)-ricin A chain (RTA) immunotoxin therapy alone and in combination with anti-p170(EGFR)-RTA in ovarian cancer cells // *Clin Cancer Res.* 1998. V.4 (10). P.2545-2550.
41. Debinski W., Karlsson B., Lindholm L., Siegall C.B., Willingham M.C., FitzGerald D., Pastan I. Monoclonal antibody C242-Pseudomonas exotoxin A. A specific and potent immunotoxin with antitumor activity on a human colon cancer xenograft in nude mice // *J Clin Invest.* 1992. V.90 (2). P.405-411.
42. Decker T., Oelsner M., Kreitman R.J., Salvatore G., Wang Q.C., Pastan I., Peschel C., Licht T. Induction of caspase-dependent programmed cell death

- in B-cell chronic lymphocytic leukemia by anti-CD22 immunotoxins // *Blood*. 2004. V.103 (7). P.2718-2726.
43. Deyev S.M., Lebedenko E.N. Modern Technologies for Creating Synthetic Antibodies for Clinical application // *Acta Naturae*. 2009. V.1 (1). P.32-50.
  44. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Pluckthun A. Design of multivalent complexes using the barnase\*barstar module // *Nat Biotechnol*. 2003. V.21 (12). P.1486-1492.
  45. Du X., Youle R.J., FitzGerald D.J., Pastan I. Pseudomonas exotoxin A-mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1 // *Mol Cell Biol*. 2010. V.30 (14). P.3444-3452.
  46. Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells // *PLoS One*. 2008. V.3 (6). P.e2434.
  47. Eigenbrot C., Randal M., Presta L., Carter P., Kossiakoff A.A. X-ray structures of the antigen-binding domains from three variants of humanized anti-p185HER2 antibody 4D5 and comparison with molecular modeling // *J Mol Biol*. 1993. V.229 (4). P.969-995.
  48. Engebraaten O., Sivam G., Juell S., Fodstad O. Systemic immunotoxin treatment inhibits formation of human breast cancer metastasis and tumor growth in nude rats // *Int J Cancer*. 2000. V.88 (6). P.970-976.
  49. Essand M., Pastan I. Anti-prostate immunotoxins: cytotoxicity of E4 antibody-Pseudomonas exotoxin constructs // *Int J Cancer*. 1998. V.77 (1). P.123-127.
  50. Filonov G.S., Piatkevich K.D., Ting L.M., Zhang J., Kim K., Verkhusha V.V. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging // *Nat Biotechnol*. 2011. V.29 (8). P.757-761.
  51. Fiszman G.L., Jasnis M.A. Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer // *Int J Breast Cancer*.

2011. V.2011 P.352182.
52. Frankel A.E., Woo J.-H., Neville D.M. Immunotoxins // Principles of Cancer Biotherapy. 2009. P.407-449.
  53. Franklin M.C., Carey K.D., Vajdos F.F., Leahy D.J., de Vos A.M., Sliwkowski M.X. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex // Cancer Cell. 2004. V.5 (4). P.317-328.
  54. Garcia J.V., Zhang F., Ford P.C. Multi-photon excitation in uncaging the small molecule bioregulator nitric oxide // Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2013. V.371 (1995). P.20120129.
  55. Geran R.I., Greenberg, N.H., Macdonald, M.M., Schumacher, A.M., Abbott, B.J. . Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems // Cancer Chemother. Rep. 1972. V.3 P.1-104.
  56. Gerashchenko T.S., Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Perelmuter V.M., Cherdyntseva N.V. Intratumor heterogeneity: nature and biological significance // Biochemistry. 2013. V.78 (11). P.1201-1215.
  57. Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E.C., Flajnik M.F. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks // Nature. 1995. V.374 (6518). P.168-173.
  58. Greulich H., Kaplan B., Mertins P., Chen T.H., Tanaka K.E., Yun C.H., Zhang X., Lee S.H., Cho J., Ambrogio L., Liao R., Imielinski M., Banerji S., Berger A.H., Lawrence M.S., Zhang J., Pho N.H., Walker S.R., Winckler W., Getz G., Frank D., Hahn W.C., Eck M.J., Mani D.R., Jaffe J.D., Carr S.A., Wong K.K., Meyerson M. Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2 // Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. V.109 (36). P.14476-14481.

59. Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldrige K.K., Tsien R.Y. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. V.97 (22). P.11990-11995.
60. Guillemard V., Nedev H.N., Berezov A., Murali R., Saragovi H.U. HER2-mediated internalization of a targeted prodrug cytotoxic conjugate is dependent on the valency of the targeting ligand // *DNA Cell Biol*. 2005. V.24 (6). P.350-358.
61. Gurskaya N.G., Verkhusha V.V., Shcheglov A.S., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light // *Nat Biotechnol*. 2006. V.24 (4). P.461-465.
62. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains // *Nature*. 1993. V.363 (6428). P.446-448.
63. Harari D., Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer // *Oncogene*. 2000. V.19 (53). P.6102-6114.
64. Hashizume T., Fukuda T., Nagaoka T., Tada H., Yamada H., Watanabe K., Salomon D.S., Seno M. Cell type dependent endocytic internalization of ErbB2 with an artificial peptide ligand that binds to ErbB2 // *Cell Biol Int*. 2008. V.32 (7). P.814-826.
65. Hassanzadeh-Ghassabeh G., Devoogdt N., De Pauw P., Vincke C., Muyldermans S. Nanobodies and their potential applications // *Nanomedicine*. 2013. V.8 (6). P.1013-1026.
66. Hazes B., Read R.J. Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells // *Biochemistry*. 1997. V.36 (37). P.11051-11054.
67. Henderson J.N., Remington S.J. Crystal structures and mutational analysis of amFP486, a cyan fluorescent protein from *Anemonia majano* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. V.102 (36). P.12712-12717.

68. Hendriks B.S., Opresko L.K., Wiley H.S., Lauffenburger D. Quantitative analysis of HER2-mediated effects on HER2 and epidermal growth factor receptor endocytosis: distribution of homo- and heterodimers depends on relative HER2 levels // *J Biol Chem.* 2003. V.278 (26). P.23343-23351.
69. Hense A., Prunsche B., Gao P., Ishitsuka Y., Nienhaus K., Nienhaus G.U. Monomeric Garnet, a far-red fluorescent protein for live-cell STED imaging // *Sci Rep.* 2015. V.5 P.18006.
70. Herter-Sprie G.S., Greulich H., Wong K.K. Activating Mutations in ERBB2 and Their Impact on Diagnostics and Treatment // *Front Oncol.* 2013. V.3 P.86.
71. Hochreiter B., Garcia A.P., Schmid J.A. Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences // *Sensors.* 2015. V.15 (10). P.26281-26314.
72. Hock A.K., Lee P., Maddocks O.D., Mason S.M., Blyth K., Vousden K.H. iRFP is a sensitive marker for cell number and tumor growth in high-throughput systems // *Cell Cycle.* 2014. V.13 (2). P.220-226.
73. Hoffman R. Imaging In Mice With Fluorescent Proteins: From Macro To Subcellular // *Sensors.* 2008. V.8 (2). P.1157.
74. Hoffman R.M. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic // *Invest New Drugs.* 1999. V.17 (4). P.343-359.
75. Hoffman R.M. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo // *Nat Rev Cancer.* 2005. V.5 (10). P.796-806.
76. Hoffman R.M. Use of fluorescent proteins and color-coded imaging to visualize cancer cells with different genetic properties // *Cancer Metastasis Rev.* 2016. V.35 (1). P.5-19.
77. Hoffman R.M., Yang M. Whole-body imaging with fluorescent proteins // *Nat Protoc.* 2006. V.1 (3). P.1429-1438.
78. Huston J.S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M.S., Novotny J.,

- Margolies M.N., Ridge R.J., Bruccoleri R.E., Haber E., Crea R., et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988. V.85 (16). P.5879-5883.
79. Hwang J., Fitzgerald D.J., Adhya S., Pastan I. Functional domains of *Pseudomonas* exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli* // *Cell*. 1987. V.48 (1). P.129-136.
80. Inocencio N.M., Moehring J.M., Moehring T.J. Furin activates *Pseudomonas* exotoxin A by specific cleavage in vivo and in vitro // *J Biol Chem*. 1994. V.269 (50). P.31831-31835.
81. Jackson M.E., Simpson J.C., Girod A., Pepperkok R., Roberts L.M., Lord J.M. The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum // *J Cell Sci*. 1999. V.112 (Pt 4). P.467-475.
82. Jenkins C.E., Swiatoniowski A., Issekutz A.C., Lin T.J. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces human mast cell apoptosis by a caspase-8 and -3-dependent mechanism // *J Biol Chem*. 2004. V.279 (35). P.37201-37207.
83. Jiguet-Jiglaire C., Cayol M., Mathieu S., Jeanneau C., Bouvier-Labit C., Ouafik L., El-Battari A. Noninvasive near-infrared fluorescent protein-based imaging of tumor progression and metastases in deep organs and intraosseous tissues // *J Biomed Opt*. 2014. V.19 (1). P.16019.
84. Katz M.H., Takimoto S., Spivack D., Moossa A.R., Hoffman R.M., Bouvet M. A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics // *J Surg Res*. 2003. V.113 (1). P.151-160.
85. Kawakami M., Kawakami K., Puri R.K. Tumor regression mechanisms by IL-13 receptor-targeted cancer therapy involve apoptotic pathways // *Int J*

- Cancer. 2003. V.103 (1). P.45-52.
86. Keppler-Hafkemeyer A., Brinkmann U., Pastan I. Role of caspases in immunotoxin-induced apoptosis of cancer cells // *Biochemistry*. 1998. V.37 (48). P.16934-16942.
  87. Keppler-Hafkemeyer A., Kreitman R.J., Pastan I. Apoptosis induced by immunotoxins used in the treatment of hematologic malignancies // *Int J Cancer*. 2000. V.87 (1). P.86-94.
  88. Kimura H., Tome Y., Momiyama M., Hayashi K., Tsuchiya H., Bouvet M., Hoffman R.M. Imaging the inhibition by anti-beta1 integrin antibody of lung seeding of single osteosarcoma cells in live mice // *Int J Cancer*. 2012. V.131 (9). P.2027-2033.
  89. Kneen M., Farinas J., Li Y., Verkman A.S. Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator // *Biophys J*. 1998. V.74 (3). P.1591-1599.
  90. Kochi S.K., Collier R.J. DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis // *Exp Cell Res*. 1993. V.208 (1). P.296-302.
  91. Kogure T., Karasawa S., Araki T., Saito K., Kinjo M., Miyawaki A. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy // *Nat Biotechnol*. 2006. V.24 (5). P.577-581.
  92. Kogure T., Kawano H., Abe Y., Miyawaki A. Fluorescence imaging using a fluorescent protein with a large Stokes shift // *Methods*. 2008. V.45 (3). P.223-226.
  93. Komatsu N., Oda T., Muramatsu T. Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and pseudomonas toxin // *J Biochem*. 1998. V.124 (5). P.1038-1044.
  94. Koopmann J.O., Albring J., Huter E., Bulbuc N., Spee P., Neefjes J.,

- Hammerling G.J., Momburg F. Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel // *Immunity*. 2000. V.13 (1). P.117-127.
95. Kreitman R.J. Immunotoxins for targeted cancer therapy // *Aaps J*. 2006. V.8 (3). P.E532-551.
96. Labas Y.A., Gurskaya N.G., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. V.99 (7). P.4256-4261.
97. Laemmli U.K., Beguin F., Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation // *J Mol Biol*. 1970. V.47 (1). P.69-85.
98. Lambert J.M., Chari R.V. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): an antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer // *J Med Chem*. 2014. V.57 (16). P.6949-6964.
99. Leblond F., Davis S.C., Valdes P.A., Pogue B.W. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications // *J Photochem Photobiol B*. 2010. V.98 (1). P.77-94.
100. Lee J.W., Soung Y.H., Seo S.H., Kim S.Y., Park C.H., Wang Y.P., Park K., Nam S.W., Park W.S., Kim S.H., Lee J.Y., Yoo N.J., Lee S.H. Somatic mutations of ERBB2 kinase domain in gastric, colorectal, and breast carcinomas // *Clin Cancer Res*. 2006. V.12 (1). P.57-61.
101. Lemmon M.A. Ligand-induced ErbB receptor dimerization // *Exp Cell Res*. 2009. V.315 (4). P.638-648.
102. Lenferink A.E., Pinkas-Kramarski R., van de Poll M.L., van Vugt M.J., Klapper L.N., Tzahar E., Waterman H., Sela M., van Zoelen E.J., Yarden Y. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers // *Embo J*. 1998. V.17 (12). P.3385-3397.

103. Li Z., Zhang Z., Bi L., Cui Z., Deng J., Wang D., Zhang X.E. Mutagenesis of mNeptune Red-Shifts Emission Spectrum to 681-685 nm // PLoS One. 2016. V.11 (4). P.e0148749.
104. Lin M.Z., McKeown M.R., Ng H.L., Aguilera T.A., Shaner N.C., Campbell R.E., Adams S.R., Gross L.A., Ma W., Alber T., Tsien R.Y. Autofluorescent proteins with excitation in the optical window for intravital imaging in mammals // Chem Biol. 2009. V.16 (11). P.1169-1179.
105. Loening A.M., Fenn T.D., Gambhir S.S. Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis* // J Mol Biol. 2007. V.374 (4). P.1017-1028.
106. London E., Luongo C.L. Domain-specific bias in arginine/lysine usage by protein toxins // Biochem Biophys Res Commun. 1989. V.160 (1). P.333-339.
107. Luker K.E., Pata P., Shemiakina, II, Pereverzeva A., Stacer A.C., Shcherbo D.S., Pletnev V.Z., Skolnaja M., Lukyanov K.A., Luker G.D., Pata I., Chudakov D.M. Comparative study reveals better far-red fluorescent protein for whole body imaging // Sci Rep. 2015. V.5 P.10332.
108. Mahmud H., Dalken B., Wels W.S. Induction of programmed cell death in ErbB2/HER2-expressing cancer cells by targeted delivery of apoptosis-inducing factor // Mol Cancer Ther. 2009. V.8 (6). P.1526-1535.
109. Martin-Killias P., Stefan N., Rothschild S., Pluckthun A., Zangemeister-Wittke U. A novel fusion toxin derived from an EpCAM-specific designed ankyrin repeat protein has potent antitumor activity // Clin Cancer Res. 2011. V.17 (1). P.100-110.
110. Massoud T.F., Gambhir S.S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light // Genes Dev. 2003. V.17 (5). P.545-580.
111. Mathew M., Verma R.S. Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy // Cancer Sci. 2009. V.100 (8).

- P.1359-1365.
112. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species // *Nat Biotechnol.* 1999. V.17 (10). P.969-973.
  113. Mazor R., Onda M., Pastan I. Immunogenicity of therapeutic recombinant immunotoxins // *Immunol Rev.* 2016. V.270 (1). P.152-164.
  114. Mazor R., Vassall A.N., Eberle J.A., Beers R., Weldon J.E., Venzon D.J., Tsang K.Y., Benhar I., Pastan I. Identification and elimination of an immunodominant T-cell epitope in recombinant immunotoxins based on *Pseudomonas* exotoxin A // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. V.109 (51). P.E3597-3603.
  115. McCluskey A.J., Olive A.J., Starnbach M.N., Collier R.J. Targeting HER2-positive cancer cells with receptor-redirectioned anthrax protective antigen // *Mol Oncol.* 2013. V.7 (3). P.440-451.
  116. McKee M.L., FitzGerald D.J. Reduction of furin-nicked *Pseudomonas* exotoxin A: an unfolding story // *Biochemistry.* 1999. V.38 (50). P.16507-16513.
  117. McKinney S.A., Murphy C.S., Hazelwood K.L., Davidson M.W., Looger L.L. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein // *Nat Methods.* 2009. V.6 (2). P.131-133.
  118. Melcher A., Gough M., Todryk S., Vile R. Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name? // *J Mol Med.* 1999. V.77 (12). P.824-833.
  119. Miesenbock G., De Angelis D.A., Rothman J.E. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins // *Nature.* 1998. V.394 (6689). P.192-195.
  120. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. Genetically encoded

- immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro // *Theranostics*. 2013. V.3 (11). P.831-840.
121. Morozova K.S., Piatkevich K.D., Gould T.J., Zhang J., Bewersdorf J., Verkhusha V.V. Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy // *Biophys J*. 2010. V.99 (2). P.L13-15.
  122. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods*. 1983. V.65 (1-2). P.55-63.
  123. Munro S., Pelham H.R. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins // *Cell*. 1987. V.48 (5). P.899-907.
  124. Nagai T., Sawano A., Park E.S., Miyawaki A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup> // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. V.98 (6). P.3197-3202.
  125. Nagata Y., Lan K.H., Zhou X., Tan M., Esteva F.J., Sahin A.A., Klos K.S., Li P., Monia B.P., Nguyen N.T., Hortobagyi G.N., Hung M.C., Yu D. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients // *Cancer Cell*. 2004. V.6 (2). P.117-127.
  126. Nelson A.L. Antibody fragments: hope and hype // *MAbs*. 2010. V.2 (1). P.77-83.
  127. Onda M., Beers R., Xiang L., Lee B., Weldon J.E., Kreitman R.J., Pastan I. Recombinant immunotoxin against B-cell malignancies with no immunogenicity in mice by removal of B-cell epitopes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. V.108 (14). P.5742-5747.
  128. Onda M., Nagata S., FitzGerald D.J., Beers R., Fisher R.J., Vincent J.J., Lee B., Nakamura M., Hwang J., Kreitman R.J., Hassan R., Pastan I. Characterization of the B cell epitopes associated with a truncated form of

- Pseudomonas exotoxin (PE38) used to make immunotoxins for the treatment of cancer patients // *J Immunol.* 2006. V.177 (12). P.8822-8834.
129. Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // *Science.* 1996. V.273 (5280). P.1392-1395.
  130. Pai-Scherf L.H., Villa J., Pearson D., Watson T., Liu E., Willingham M.C., Pastan I. Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor // *Clin Cancer Res.* 1999. V.5 (9). P.2311-2315.
  131. Pai L.H., Bookman M.A., Ozols R.F., Young R.C., Smith J.W., 2nd, Longo D.L., Gould B., Frankel A., McClay E.F., Howell S., et al. Clinical evaluation of intraperitoneal *Pseudomonas exotoxin* immunoconjugate OVB3-PE in patients with ovarian cancer // *J Clin Oncol.* 1991. V.9 (12). P.2095-2103.
  132. Panowski S., Bhakta S., Raab H., Polakis P., Junutula J.R. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy // *MAbs.* 2014. V.6 (1). P.34-45.
  133. Pardo A., Stocker M., Kampmeier F., Melmer G., Fischer R., Thepen T., Barth S. In vivo imaging of immunotoxin treatment using *Katushka*-transfected A-431 cells in a murine xenograft tumour model // *Cancer Immunol Immunother.* 2012. V.61 (10). P.1617-1626.
  134. Pastan I., Hassan R., FitzGerald D.J., Kreitman R.J. Immunotoxin treatment of cancer // *Annu Rev Med.* 2007. V.58 P.221-237.
  135. Pedersen K., Angelini P.D., Laos S., Bach-Faig A., Cunningham M.P., Ferrer-Ramon C., Luque-Garcia A., Garcia-Castillo J., Parra-Palau J.L., Scaltriti M., Ramon y Cajal S., Baselga J., Arribas J. A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis // *Mol Cell Biol.* 2009. V.29 (12). P.3319-3331.
  136. Petersen J., Wilmann P.G., Beddoe T., Oakley A.J., Devenish R.J., Prescott

- M., Rossjohn J. The 2.0-Å crystal structure of eqFP611, a far red fluorescent protein from the sea anemone *Entacmaea quadricolor* // *J Biol Chem*. 2003. V.278 (45). P.44626-44631.
137. Piatkevich K.D., Hulit J., Subach O.M., Wu B., Abdulla A., Segall J.E., Verkhusha V.V. Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. V.107 (12). P.5369-5374.
138. Piatkevich K.D., Malashkevich V.N., Morozova K.S., Nemkovich N.A., Almo S.C., Verkhusha V.V. Extended Stokes shift in fluorescent proteins: chromophore-protein interactions in a near-infrared TagRFP675 variant // *Sci Rep*. 2013. V.3 P.1847.
139. Piechocki M.P., Ho Y.S., Pilon S., Wei W.Z. Human ErbB-2 (Her-2) transgenic mice: a model system for testing Her-2 based vaccines // *J Immunol*. 2003. V.171 (11). P.5787-5794.
140. Polanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. ERBB oncogene proteins as targets for monoclonal antibodies // *Biochemistry*. 2012. V.77 (3). P.227-245.
141. Pribluda A., de la Cruz C.C., Jackson E.L. Intratumoral Heterogeneity: From Diversity Comes Resistance // *Clin Cancer Res*. 2015. V.21 (13). P.2916-2923.
142. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. A new anticancer toxin based on HER2/neu-specific DARPIn and photoactive flavoprotein miniSOG // *Biochimie*. 2015. V.118 P.116-122.
143. Puaux A.L., Ong L.C., Jin Y., Teh I., Hong M., Chow P.K., Golay X., Abastado J.P. A comparison of imaging techniques to monitor tumor growth and cancer progression in living animals // *Int J Mol Imaging*. 2011. V.2011 P.321538.
144. Reiter Y., Pastan I. Antibody engineering of recombinant Fv immunotoxins for improved targeting of cancer: disulfide-stabilized Fv immunotoxins // *Clin Cancer Res*. 1996. V.2 (2). P.245-252.

145. Ribbert T., Thepen T., Tur M.K., Fischer R., Huhn M., Barth S. Recombinant, ETA'-based CD64 immunotoxins: improved efficacy by increased valency, both in vitro and in vivo in a chronic cutaneous inflammation model in human CD64 transgenic mice // *Br J Dermatol*. 2010. V.163 (2). P.279-286.
146. Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis // *Annu Rev Phys Chem*. 1996. V.47 P.555-606.
147. Risberg K., Fodstad O., Andersson Y. The melanoma specific 9.2.27PE immunotoxin efficiently kills melanoma cells in vitro // *Int J Cancer*. 2009. V.125 (1). P.23-33.
148. Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.S., Glenney J.R., Anderson R.G. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats // *Cell*. 1992. V.68 (4). P.673-682.
149. Rothberg K.G., Ying Y.S., Kamen B.A., Anderson R.G. Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate // *J Cell Biol*. 1990. V.111 (6 Pt 2). P.2931-2938.
150. Rubin I., Yarden Y. The basic biology of HER2 // *Ann Oncol*. 2001. V.12 (1). P.S3-8.
151. Ruggeri B.A., Camp F., Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery // *Biochem Pharmacol*. 2014. V.87 (1). P.150-161.
152. Ruigrok V.J., Levisson M., Eppink M.H., Smidt H., van der Oost J. Alternative affinity tools: more attractive than antibodies? // *Biochem J*. 2011. V.436 (1). P.1-13.
153. Sandell J.L., Zhu T.C. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT // *J Biophotonics*. 2011. V.4 (11-12). P.773-787.
154. Sato K., Choyke P.L., Kobayashi H. Photoimmunotherapy of gastric cancer peritoneal carcinomatosis in a mouse model // *PLoS One*. 2014. V.9 (11).

P.e113276.

155. Schlehuber S., Skerra A. Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins" // *Drug Discov Today*. 2005. V.10 (1). P.23-33.
156. Schumann J., Angermuller S., Bang R., Lohoff M., Tiegs G. Acute hepatotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in mice depends on T cells and TNF // *J Immunol*. 1998. V.161 (10). P.5745-5754.
157. Seetharam S., Chaudhary V.K., FitzGerald D., Pastan I. Increased cytotoxic activity of *Pseudomonas* exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL // *J Biol Chem*. 1991. V.266 (26). P.17376-17381.
158. Segawa K., Nagata S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure // *Trends Cell Biol*. 2015. V.25 (11). P.639-650.
159. Segovia-Mendoza M., Gonzalez-Gonzalez M.E., Barrera D., Diaz L., Garcia-Becerra R. Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence // *Am J Cancer Res*. 2015. V.5 (9). P.2531-2561.
160. Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. V.106 (23). P.9221-9225.
161. Shan L., Liu Y., Wang P. Recombinant Immunotoxin Therapy of Solid Tumors: Challenges and Strategies // *J Basic Clin Med*. 2013. V.2 (2). P.1-6.
162. Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat Biotechnol*. 2004. V.22 (12). P.1567-1572.
163. Shapira A., Benhar I. Toxin-based therapeutic approaches // *Toxins*. 2010. V.2 (11). P.2519-2583.

164. Sharma A.K., FitzGerald D. Pseudomonas exotoxin kills Drosophila S2 cells via apoptosis // *Toxicon*. 2010. V.56 (6). P.1025-1034.
165. Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging // *Nat Methods*. 2013. V.10 (8). P.751-754.
166. Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zraisky A.G., Lukyanov S., Chudakov D.M. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging // *Nat Methods*. 2007. V.4 (9). P.741-746.
167. Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., Lukyanov S., Zraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues // *Biochem J*. 2009. V.418 (3). P.567-574.
168. Shcherbo D., Shemiakina, II, Ryabova A.V., Luker K.E., Schmidt B.T., Souslova E.A., Gorodnicheva T.V., Strukova L., Shidlovskiy K.M., Britanova O.V., Zraisky A.G., Lukyanov K.A., Loschenov V.B., Luker G.D., Chudakov D.M. Near-infrared fluorescent proteins // *Nat Methods*. 2010. V.7 (10). P.827-829.
169. Shirmanova M.V., Serebrovskaya E.O., Lukyanov K.A., Snopova L.B., Sirotkina M.A., Prodanetz N.N., Bugrova M.L., Minakova E.A., Turchin I.V., Kamensky V.A., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice // *J Biophotonics*. 2013. V.6 (3). P.283-290.
170. Shkrob M., Mishin A.S., Chudakov D.M., Labas Iu A., Luk'ianov K.A. [Chromoproteins of the green fluorescent protein family: properties and applications] // *Bioorg Khim*. 2008. V.34 (5). P.581-590.
171. Shu X., Royant A., Lin M.Z., Aguilera T.A., Lev-Ram V., Steinbach P.A., Tsien R.Y. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome // *Science*. 2009. V.324 (5928).

P.804-807.

172. Signoretti S., Montironi R., Manola J., Altimari A., Tam C., Bubley G., Balk S., Thomas G., Kaplan I., Hlatky L., Hahnfeldt P., Kantoff P., Loda M. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer // *J Natl Cancer Inst.* 2000. V.92 (23). P.1918-1925.
173. Skerra A. Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition // *Curr Opin Biotechnol.* 2007. V.18 (4). P.295-304.
174. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A., et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer // *Science.* 1989. V.244 (4905). P.707-712.
175. Sorkin A., Di Fiore P.P., Carpenter G. The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired // *Oncogene.* 1993. V.8 (11). P.3021-3028.
176. Staudinger M., Glorius P., Burger R., Kellner C., Klausz K., Gunther A., Repp R., Klapper W., Gramatzki M., Peipp M. The novel immunotoxin HM1.24-ETA' induces apoptosis in multiple myeloma cells // *Blood Cancer J.* 2014. V.4 P.e219.
177. Stephens P., Hunter C., Bignell G., Edkins S., Davies H., Teague J., Stevens C., O'Meara S., Smith R., Parker A., Barthorpe A., Blow M., Brackenbury L., Butler A., Clarke O., Cole J., Dicks E., Dike A., Drozd A., Edwards K., Forbes S., Foster R., Gray K., Greenman C., Halliday K., Hills K., Kosmidou V., Lugg R., Menzies A., Perry J., Petty R., Raine K., Ratford L., Shepherd R., Small A., Stephens Y., Tofts C., Varian J., West S., Widaa S., Yates A., Brasseur F., Cooper C.S., Flanagan A.M., Knowles M., Leung S.Y., Louis D.N., Looijenga L.H., Malkowicz B., Pierotti M.A., Teh B., Chenevix-Trench G., Weber B.L., Yuen S.T., Harris G., Goldstraw P., Nicholson A.G., Futreal P.A., Wooster R., Stratton M.R. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours // *Nature.* 2004. V.431

- (7008). P.525-526.
178. Strack R.L., Hein B., Bhattacharyya D., Hell S.W., Keenan R.J., Glick B.S. A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling // *Biochemistry*. 2009. V.48 (35). P.8279-8281.
  179. Subach F.V., Patterson G.H., Manley S., Gillette J.M., Lippincott-Schwartz J., Verkhusa V.V. Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy // *Nat Methods*. 2009. V.6 (2). P.153-159.
  180. Tallini Y.N., Ohkura M., Choi B.R., Ji G., Imoto K., Doran R., Lee J., Plan P., Wilson J., Xin H.B., Sanbe A., Gulick J., Mathai J., Robbins J., Salama G., Nakai J., Kotlikoff M.I. Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca<sup>2+</sup> indicator GCaMP2 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. V.103 (12). P.4753-4758.
  181. Tanaka N., Lajud S.A., Ramsey A., Szymanowski A.R., Ruffner R., O'Malley B.W., Jr., Li D. Application of infrared-based molecular imaging to a mouse model with head and neck cancer // *Head Neck*. 2016. V.38 Suppl 1 P.E1351-1357.
  182. Tanner M., Hollmen M., Junttila T.T., Kapanen A.I., Tammola S., Soini Y., Helin H., Salo J., Joensuu H., Sihvo E., Elenius K., Isola J. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab // *Ann Oncol*. 2005. V.16 (2). P.273-278.
  183. Tao Y., Shen C., Luo S., Traore W., Marchetto S., Santoni M.J., Xu L., Wu B., Shi C., Mei J., Bates R., Liu X., Zhao K., Xiong W.C., Borg J.P., Mei L. Role of Erbin in ErbB2-dependent breast tumor growth // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. V.111 (42). P.E4429-4438.
  184. Tejuca M., Diaz I., Figueredo R., Roque L., Pazos F., Martinez D., Iznaga-Escobar N., Perez R., Alvarez C., Lanio M.E. Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line // *Int Immunopharmacol*. 2004. V.4

- (6). P.731-744.
185. Thompson J., Stavrou S., Weetall M., Hexham J.M., Digan M.E., Wang Z., Woo J.H., Yu Y., Mathias A., Liu Y.Y., Ma S., Gordienko I., Lake P., Neville D.M., Jr. Improved binding of a bivalent single-chain immunotoxin results in increased efficacy for in vivo T-cell depletion // *Protein Eng.* 2001. V.14 (12). P.1035-1041.
  186. Tsien R.Y. The green fluorescent protein // *Annu Rev Biochem.* 1998. V.67 P.509-544.
  187. Vaidyanath A., Hashizume T., Nagaoka T., Takeyasu N., Satoh H., Chen L., Wang J., Kasai T., Kudoh T., Satoh A., Fu L., Seno M. Enhanced internalization of ErbB2 in SK-BR-3 cells with multivalent forms of an artificial ligand // *J Cell Mol Med.* 2011. V.15 (11). P.2525-2538.
  188. Valabrega G., Montemurro F., Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer // *Ann Oncol.* 2007. V.18 (6). P.977-984.
  189. Vermeij J., Teugels E., Bourgain C., Xiangming J., in 't Veld P., Ghislain V., Neyns B., De Greve J. Genomic activation of the EGFR and HER2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers // *BMC Cancer.* 2008. V.8 (3). P.1471-2407.
  190. Wakankar A., Chen Y., Gokarn Y., Jacobson F.S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates // *MAbs.* 2011. V.3 (2). P.161-172.
  191. Wang F., Ren J., Qiu X.C., Wang L.F., Zhu Q., Zhang Y.Q., Huan Y., Meng Y.L., Yao L.B., Chen S.Y., Xu Y.M., Yang A.G. Selective cytotoxicity to HER2-positive tumor cells by a recombinant e23sFv-TD-tBID protein containing a furin cleavage sequence // *Clin Cancer Res.* 2010. V.16 (8). P.2284-2294.
  192. Wang L., Jackson W.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation // *Proc Natl Acad*

- Sci U S A. 2004. V.101 (48). P.16745-16749.
193. Wang L.H., Rothberg K.G., Anderson R.G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation // *J Cell Biol.* 1993. V.123 (5). P.1107-1117.
  194. Weidle U.H., Georges G., Brinkmann U. Fully human targeted cytotoxic fusion proteins: new anticancer agents on the horizon // *Cancer Genomics Proteomics.* 2012. V.9 (3). P.119-133.
  195. Weiner G.J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics // *Nat Rev Cancer.* 2015. V.15 (6). P.361-370.
  196. Weissleder R. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice // *Nat Rev Cancer.* 2002. V.2 (1). P.11-18.
  197. Weldon J.E., Pastan I. A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer // *Febs J.* 2011. V.278 (23). P.4683-4700.
  198. Wen C.C., Cheng S.A., Hsuen S.P., Huang Y.L., Kuo Z.K., Lee H.F., Kuo C.H., Du J.L., Wang W.B. SV40 T/t-common polypeptide specifically induces apoptosis in human cancer cells that overexpress HER2/neu // *Cancer Res.* 2006. V.66 (11). P.5847-5857.
  199. Wieduwilt M.J., Moasser M.M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics // *Cell Mol Life Sci.* 2008. V.65 (10). P.1566-1584.
  200. Willuda J., Honegger A., Waibel R., Schubiger P.A., Stahel R., Zangemeister-Wittke U., Pluckthun A. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment // *Cancer Res.* 1999. V.59 (22). P.5758-5767.
  201. Willuda J., Kubetzko S., Waibel R., Schubiger P.A., Zangemeister-Wittke U., Pluckthun A. Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides // *J*

- Biol Chem. 2001. V.276 (17). P.14385-14392.
202. Winnard P.T., Jr., Kluth J.B., Raman V. Noninvasive optical tracking of red fluorescent protein-expressing cancer cells in a model of metastatic breast cancer // *Neoplasia*. 2006. V.8 (10). P.796-806.
203. Wolf P., Elsasser-Beile U. Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent // *Int J Med Microbiol*. 2009. V.299 (3). P.161-176.
204. Wu J., Ma R., Cao H., Wang Z., Jing C., Sun Y., Zhang Y., Yang Z., Hoffman R.M., Tang J. Intraoperative imaging of metastatic lymph nodes using a fluorophore-conjugated antibody in a HER2/neu-expressing orthotopic breast cancer mouse model // *Anticancer Res*. 2013. V.33 (2). P.419-424.
205. Xu W., Mimnaugh E., Rosser M.F., Nicchitta C., Marcu M., Yarden Y., Neckers L. Sensitivity of mature Erbb2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90 // *J Biol Chem*. 2001. V.276 (5). P.3702-3708.
206. Yaginuma Y., Westphal H. Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines // *Cancer Res*. 1992. V.52 (15). P.4196-4199.
207. Yampolsky I.V., Kislukhin A.A., Amatov T.T., Shcherbo D., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Synthesis and properties of the red chromophore of the green-to-red photoconvertible fluorescent protein Kaede and its analogs // *Bioorg Chem*. 2008. V.36 (2). P.96-104.
208. Yan M., Parker B.A., Schwab R., Kurzrock R. HER2 aberrations in cancer: implications for therapy // *Cancer Treat Rev*. 2014. V.40 (6). P.770-780.
209. Yang M., Baranov E., Jiang P., Sun F.X., Li X.M., Li L., Hasegawa S., Bouvet M., Al-Tuwaijri M., Chishima T., Shimada H., Moossa A.R., Penman S., Hoffman R.M. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. V.97 (3). P.1206-1211.

210. Yang M., Baranov E., Li X.M., Wang J.W., Jiang P., Li L., Moossa A.R., Penman S., Hoffman R.M. Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors // Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. V.98 (5). P.2616-2621.
211. Yang M., Jiang P., Hoffman R.M. Whole-body subcellular multicolor imaging of tumor-host interaction and drug response in real time // Cancer Res. 2007. V.67 (11). P.5195-5200.
212. Yang M., Li L., Jiang P., Moossa A.R., Penman S., Hoffman R.M. Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells // Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. V.100 (24). P.14259-14262.
213. Yarbrough D., Wachter R.M., Kallio K., Matz M.V., Remington S.J. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution // Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. V.98 (2). P.462-467.
214. Yarden Y., Sliwkowski M.X. Untangling the ErbB signalling network // Nat Rev Mol Cell Biol. 2001. V.2 (2). P.127-137.
215. Yu C.J., Jia L.T., Meng Y.L., Zhao J., Zhang Y., Qiu X.C., Xu Y.M., Wen W.H., Yao L.B., Fan D.M., Jin B.Q., Chen S.Y., Yang A.G. Selective proapoptotic activity of a secreted recombinant antibody/AIF fusion protein in carcinomas overexpressing HER2 // Gene Ther. 2006. V.13 (4). P.313-320.
216. Yu D., Gustafson W.C., Han C., Lafaye C., Noirclerc-Savoye M., Ge W.P., Thayer D.A., Huang H., Kornberg T.B., Royant A., Jan L.Y., Jan Y.N., Weiss W.A., Shu X. An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging // Nat Commun. 2014. V.5 P.3626.
217. Zhang M., Qiu Z., Li Y., Yang Y., Zhang Q., Xiang Q., Su Z., Huang Y. Construction and characterization of a recombinant human beta defensin 2 fusion protein targeting the epidermal growth factor receptor: in vitro study // Appl Microbiol Biotechnol. 2013. V.97 (9). P.3913-3923.

218. Zhu X., Tao K., Li Y., Li S., Zhang L., Wang D., Zhong L., Feng W. A new recombinant immunotoxin hscFv-ETA' demonstrates specific cytotoxicity against chronic myeloid leukemia cells in vitro // Immunol Lett. 2013. V.154 (1-2). P.18-24.
219. Zielinski R., Lyakhov I., Hassan M., Kuban M., Shafer-Weaver K., Gandjbakhche A., Capala J. HER2-affitoxin: a potent therapeutic agent for the treatment of HER2-overexpressing tumors // Clin Cancer Res. 2011. V.17 (15). P.5071-5081.