

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Институт экспериментальной медицины»

На правах рукописи

ЕЛИСЕЕВ  
Игорь Евгеньевич

**Однодоменные антитела ламы для блокирования активации рецептора ErbB3:  
разработка, структурно-функциональные исследования,  
перспективы применения в иммунотерапии**

1.5.4 — Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Шамова Ольга Валерьевна  
доктор биологических наук, профессор  
член-корреспондент РАН

Санкт-Петербург — 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 Рецепторы эпидермального фактора роста ErbB1–4: EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4 .....	17
1.1.1 Лиганды рецепторов ErbB .....	18
1.1.2 Структура рецепторов ErbB .....	19
1.1.3 Механизм активации рецепторов ErbB .....	21
1.2 Функции рецепторов ErbB и их роль в норме и патологии .....	25
1.2.1 Функции рецепторов ErbB и их лигандов в норме .....	25
1.2.2 Рецепторы EGFR и HER2 как классические онкогены .....	27
1.3 Проблема резистентности опухолей к блокированию HER2 и роль рецептора ErbB3 в ее формировании .....	29
1.4 Фармакологическое блокирование рецепторов HER2 и ErbB3.....	31
1.4.1 Моноклональные антитела к рецептору HER2 .....	31
1.4.2 Моноклональные антитела к рецептору ErbB3 .....	33
1.4.3 Иммуноконъюгаты с цитотоксическими лекарствами.....	39
1.4.4 Альтернативные подходы для блокирования ErbB3 .....	41
1.5 Однодоменные антитела верблюдовых как альтернатива классическим IgG .....	43
1.5.1 Структура и свойства однодоменных антител .....	43
1.5.2 Использование технологий ДНК библиотек и фагового дисплея для отбора однодоменных антител .....	47
1.5.3 Системы для рекомбинантной экспрессии однодоменных антител .....	50
1.5.4 Области и форматы терапевтического применения однодоменных антител.....	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	56
2.1 Материалы .....	56
2.1.1 Реагенты и расходные материалы.....	56
2.1.2 Штаммы бактерий и клеточные культуры.....	57
2.2 Молекулярное клонирование и секвенирование.....	58
2.2.1 Создание генетических конструкций .....	58
2.2.2 Секвенирование и анализ данных.....	62
2.3 Экспрессия и очистка рекомбинантных белков.....	63
2.3.1 Бактериальная экспрессия однодоменных антител .....	63
2.3.2 Экспрессия фрагментов рецептора ErbB3 в клетках млекопитающих .....	65
2.4 Анализ структуры и стабильности однодоменных антител .....	66
2.4.1 Анализ спектров кругового дихроизма.....	66

2.4.2 Аналитическая гель-фильтрация .....	67
2.4.3 Определение дисульфидных связей методом Элмана.....	67
2.4.4 Анализ посттрансляционных модификаций при помощи масс-спектрометрии.....	68
2.4.5 Получение кривых денатурации и анализ термодинамической стабильности.....	69
2.5 Макромолекулярная кристаллография и моделирование .....	70
2.5.1 Поиск и оптимизация условий кристаллизации.....	70
2.5.2 Съемка и обработка рентгеновских данных .....	70
2.5.3 Молекулярное моделирование комплексов антител с рецептором ErbB3 .....	71
2.6 Исследования связывания однодоменных антител с рецептором.....	72
2.6.1 Изучение кинетики и аффинности связывания однодоменных антител с рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса .....	72
2.6.2 Эпитопное картирование и изучение конкуренции с лигандом.....	73
2.6.3 Флуоресцентная конфокальная микроскопия .....	73
2.7 Изучение антипролиферативной активности однодоменных антител .....	74
2.7.1 Тесты на антипролиферативную активность.....	74
2.7.2 Проточная цитофлуориметрия.....	75
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>76</b>
3.1 Совершенствование технологий отбора антител.....	76
3.1.1 Изучение ошибок и изменения клонального разнообразия при амплификации сложных библиотек ДНК .....	76
3.1.2 Теоретическая модель эффективности амплификации библиотеки ДНК, инкапсулированной в капли эмульсии.....	80
3.2 Разработка системы гетерологической экспрессии однодоменных антител .....	85
3.2.1 Экспрессия в бактериях <i>E. coli</i> $\Delta trxB \Delta gor$ сDsbC в виде химеры с белком SUMO позволяет получать растворимые фолдированные однодоменные антитела без молекулярных тагов.....	85
3.2.2 Цитоплазматическая экспрессия имеет большую эффективность чем классическая система периплазматической экспрессии .....	90
3.3 Структурные и биохимические характеристики однодоменных антител.....	92
3.3.1 Исследованные однодоменные антитела находятся в мономерной форме и обладают вторичной структурой, характерной для иммуноглобулинового домена.....	92
3.3.2 Однодоменные антитела BCD090-P1 и BCD090-M2, но не BCD090-M456, имеют каноническую дисульфидную связь.....	96
3.3.3 Однодоменное антитело BCD090-P1 обладает уникальной термодинамической стабильностью .....	99
3.4 Исследование пространственных структур высокого разрешения.....	102
3.4.1 Изучение пространственных структур однодоменного антитела BCD090-M2 в различных кристаллических формах.....	102
3.4.2 Моделирование комплекса однодоменного антитела BCD090-M2 с эктодоменом рецептора ErbB3 .....	108

3.5	Взаимодействие однодоменных антител с рецептором ErbB3 .....	110
3.5.1	Однодоменные антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 связываются с эктодоменом ErbB3 с высокой аффинностью .....	110
3.5.2	BCD090-P1 и BCD090-M2 взаимодействуют с разными эпитопами .....	113
3.5.3	Однодоменные антитела связываются с рецептором на опухолевых клетках и ко-локализуются с HER2 и ErbB3 .....	116
3.6	Антипролиферативное действие однодоменных антител .....	119
3.6.1	Однодоменные антитела подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию клеток рака молочной железы MCF-7 .....	119
3.6.2	Однодоменные антитела подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию гиперэкспрессирующих рецептор HER2 клеток рака молочной железы SK-BR-3 .....	122
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	126
	ВЫВОДЫ .....	128
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	129
	БЛАГОДАРНОСТИ .....	147



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

## Структура антител

- CDR** гипервариабельные участки вариабельного домена, определяющие связывание с антигеном: H1–3 тяжелой цепи, L1–3 легкой цепи, 1–3 однодоменного антитела
- CH** константный домен тяжелой цепи (CH1–3)
- CL** константный домен легкой цепи
- Fab** антигенсвязывающий фрагмент антитела, состоящий из доменов VH, VL, CH1 и CL
- Fc** отвечающий за эффекторные функции фрагмент антитела, состоящий из CH2 и CH3
- FR** каркасные области вариабельного домена (FR1–4)
- sdAb** однодоменное антитело, то же, что VHH
- VH** вариабельный домен тяжелой цепи классического антитела
- VHH** вариабельный домен тяжелоцепочечного антитела верблюдовых
- VL** вариабельный домен легкой цепи классического антитела

## Гены и белки

- Akt** протеинкиназа B, группа из 3-х родственных серин/треониновых киназ
- BiP** иммуноглобулин-связывающий белок, шаперон, кодируемый геном HSPA5
- CD20** B-лимфоцитарный антиген, мишень ритуксимаба, кодируется геном MS4A1
- CD16A** активирующий Fc $\gamma$  рецептор, кодируемый геном FCGR3A
- CD32B** ингибирующий Fc $\gamma$  рецептор, кодируемый геном FCGR2B
- CD3** мембранный комплекс, коактиватор T-клеток в составе T-клеточного рецептора
- DsbC** бактериальный фермент дисульфид-изомераза
- ECD** внеклеточный домен (эктодомен) рецептора ErbB3, ECD<sup>III</sup> — субдомен III
- EGF** эпидермальный фактор роста
- EGFR** рецептор эпидермального фактора роста, кодируемый геном ErbB1
- ER** рецептор эстрогена
- ErbB** семейство рецепторов эпидермального фактора роста ErbB1–4
- ErbB3** рецептор эпидермального фактора роста, кодируемый геном ErbB3, также HER3
- ErbB4** рецептор эпидермального фактора роста, кодируемый геном ErbB4, также HER4
- FcRn** неонатальный Fc рецептор
- gor** бактериальный фермент глутатион-редуктаза
- HER2** рецептор эпидермального фактора роста, кодируемый геном ErbB2
- HRG** херегулин  $\beta$ 1, одна из изоформ NRG1
- HSA** человеческий сывороточный альбумин
- MAPK** митоген-активируемые протеинкиназы, семейство протеинкиназ

<b>neu</b>	онкоген нейробластом крыс, гомолог HER2
<b>NRG</b>	нейрегулины 1–4, группа лигандов рецепторов ErbB3 и ErbB4
<b>PD1</b>	рецептор программируемой клеточной гибели, кодируемый геном PDCD1
<b>PI3K</b>	фосфоинозитид-3-киназы
<b>PTEN</b>	фосфатаза, кодируемая геном PTEN, антионкобелок
<b>p53</b>	транскрипционный фактор, кодируемый геном TP53, антионкобелок
<b>p73</b>	родственный p53 антионкобелок, кодируемый геном TP73
<b>p85</b>	адаптерный белок, регуляторный компонент PI3K
<b>Ras</b>	семейство гомологичных ГТФаз, мощных онкогенов
<b>Shc</b>	адаптерный белок, связывающийся с рецепторами ErbB, онкоген
<b>SH2</b>	белковый домен, ответственный за распознавание фосфотирозинов
<b>SUMO</b>	убиквитин-подобный белок
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	трансформирующий фактор роста- $\alpha$
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	фактор некроза опухоли- $\alpha$
<b>trxB</b>	бактериальный фермент тиоредоксин-редуктаза
<b>vWF</b>	фактор фон Виллебранда
<b>v-erbB</b>	онкоген, вирусный гомолог EGFR

### Реагенты

<b>DTT</b>	дитиотрейтол
<b>EDC</b>	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
<b>EDTA</b>	этилендиаминтетрауксусная кислота
<b>FBS</b>	эмбриональная бычья сыворотка
<b>HBS</b>	буфер на основе HEPES с 150 мМ NaCl
<b>HEPES</b>	4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота
<b>IPTG</b>	изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид
<b>LB</b>	стандартная ростовая среда для бактерий, “lysogeny broth”
<b>MES</b>	морфолино-2-этансульфоновая кислота
<b>MTS</b>	реагент для спектрофотометрического определения пролиферации, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий
<b>NHS</b>	N-гидроксисукцинимид
<b>NTA</b>	нитрилотриуксусная кислота, Ni-NTA — сорбент для хроматографии
<b>NTB</b>	тионитрофильный анион, продукт реакции тиольной группы с реагентом Элмана
<b>NTSB</b>	2-нитро-5-тиосульфобензоат натрия
<b>PBS</b>	фосфатно-солевой буфер
<b>PEG</b>	полиэтиленгликоль

<b>PMSF</b>	фенилметилсульфонилфторид, ингибитор протеаз
<b>PNGаза</b>	пептид-N-гликозидаза, фермент для дегликозилирования белков
<b>SDS</b>	додецилсульфат натрия
<b>TB</b>	богатая ростовая среда для бактерий, “terrific broth”
<b>TEV</b>	протеаза вируса табачной мозаики
<b>Tris</b>	трис(гидроксиметил)аминометан
<b>АТФ</b>	аденозинтрифосфат

### Прочее

<b>CMV</b>	цитомегаловирус, hCMV — соответствующий промотор
<b>DM1</b>	мертанзин, высокоактивный токсин из класса маитанзинов
<b>FDA</b>	Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США
<b>IMAC</b>	металл-хелатная хроматография
<b>NGS</b>	секвенирование следующего поколения
<b>PDB</b>	база данных белковых структур Protein Data Bank ( <a href="http://www.rcsb.org">www.rcsb.org</a> )
<b>pelB</b>	сигнальный пептид, определяющий транспорт в периплазму
<b>pRha</b>	рамнозный промотор <i>E. coli</i>
<b>RMSD</b>	среднеквадратичное отклонение
<b>RSV</b>	респираторно-синцитиальный вирус
<b>RU</b>	единицы отклика поверхностного плазмонного резонанса, “resonance units”
<b>SAD</b>	метод одноволновой аномальной дифракции
<b>SEC</b>	аппарат транслокации в периплазму в бактериях <i>E. coli</i>
<b>КД</b>	круговой дихроизм
<b>ПЦР</b>	полимеразная цепная реакция

---

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Иммунотерапия при помощи моноклональных антител, предсказанная более века назад Паулем Эрлихом [1], реализует принципы идеального этиотропного лечения, воздействующего специфически на вызывающие болезнь факторы. Многие десятилетия прошли, прежде чем реализация идей Эрлиха стала возможной благодаря созданию технологии гибридом для получения моноклональных антител [2]. Именно так было получено первое терапевтическое антитело, муромонаб CD3 [3], применяющееся для подавления отторжения трансплантата [4]. Вскоре были разработаны ключевые технологии для конструирования библиотек генов иммуноглобулинов, отбора антител необходимой специфичности и их гуманизации [5]. Создание эффективной технологической платформы для разработки антител позволило им стать основным классом новых лекарств в последние годы, особенно в области клинической иммунологии и онкологии [6]. К 2021 году общее количество одобренных для терапевтического применения антител достигло ста [7], что демонстрирует ценность этих молекул для медицины.

Мишенями терапевтических антител чаще всего являются рецепторы на поверхности клеток. Терапевтические антитела к рецепторам могут вызывать лизис определенных типов клеток посредством активации системы комплемента [8] и задействования эффекторных клеток [9; 10]. Помимо прямого цитотоксического действия моноклональные антитела также могут выполнять роль агонистов [11; 12] или антагонистов рецепторов [13], тем самым воздействуя на внутриклеточные сигнальные пути и меняя фенотип клеток.

Важнейшими мишенями в терапии онкологических заболеваний являются рецепторные тирозинкиназы, в особенности представители семейства рецепторов эпидермального фактора роста ErbB [14]. Четыре рецептора ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4) служат интерфейсом к сложной сигнальной сети, регулирующей ключевые клеточные процессы в развитии эпителия, сердца, нервной системы и молочной железы [15]. Нарушения сигнализации рецепторами EGFR и HER2, вызванные амплификацией их генов, делециями во внеклеточном домене, активирующими мутациями во внутриклеточном киназном домене или коэкспрессией лиганда, приводят к развитию рака молочной железы, легких и колоректального рака [16]. Онкогенная природа рецепторов EGFR и HER2 обусловлена функциями регулируемых ими сигнальных путей. Среди них можно прежде всего выделить путь Ras-МАРК, запускающий клеточную пролиферацию, и путь PI3K-Акт, обеспечивающий выживание клеток за счет подавления апоптоза [17; 18]. Активация рецепторов ErbB начинается со связывания лиганда, который индуцирует конформационные изменения во внеклеточном домене, ведущие к димеризации рецепторов и последующей аллостерической активации внутриклеточного

киназного домена. Существующие терапевтические моноклональные антитела подавляют процесс активации рецепторов EGFR и HER2 посредством конкуренции с лигандом, а также препятствования необходимым конформационным изменениям внеклеточного домена или прямого блокирования димеризации [18]. Клиническая эффективность первых терапевтических моноклональных антител к рецепторам EGFR и HER2, цетуксимаба [19] и трастузумаба [20], продемонстрировала перспективы данного подхода. В настоящее время моноклональные антитела к рецептору HER2 являются стандартной терапией при раке молочной железы с повышенной экспрессией данного рецептора как в виде одиночных антител и их комбинаций, так и в составе иммуноконъюгатов с цитотоксическими лекарствами [21].

Долгое время считалось, что рецептор ErbB3 не проявляет тирозинкиназной активности [22] и, следовательно, не участвует в сигнальных путях опухолевой клетки. В связи с этим ErbB3 не рассматривался как важная терапевтическая мишень. Однако клинические исследования продемонстрировали, что повышенная экспрессия ErbB3 в опухолях молочной железы прогнозирует более низкую выживаемость [23; 24]. С молекулярной точки зрения, два из четырех рецепторов ErbB не автономны: HER2 не взаимодействует с лигандами [25] а ErbB3 каталитически неактивен, что допускает их активацию только в составе гетеродимеров. В частности, отклик рецептора ErbB3 на связывание естественного лиганда, херегулина, осуществляется через HER2-опосредованную трансактивацию, происходящую в гетеродимерах HER2:ErbB3 [26]. Пролиферация клеток рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2 требует ErbB3, указывая на то, что именно гетеродимер HER2:ErbB3 является мощным онкогенным элементом [27]. Активация данного гетеродимера задействует как сигнальный путь пролиферации Ras-МАРК через единственный сайт фосфорилирования на С-конце HER2 [28], так и антиапоптотический путь PI3K-Akt через шесть сайтов фосфорилирования на С-конце ErbB3 [29].

Актуальность исследования обусловлена необходимостью разработки новых иммунотерапевтических подходов и молекул для блокирования активации рецептора ErbB3. Важность рецептора ErbB3 как терапевтической мишени связана не только с его участием в процессе опухолевой трансформации, но и с его центральной ролью в развитии резистентности раковых клеток к ингибированию HER2. Блокирование HER2 при помощи ингибиторов тирозинкиназ ведет к увеличению экспрессии ErbB3 и активации антиапоптотического сигнального пути PI3K-Akt, делающего ингибиторы неэффективными [30; 31]. При этом подавление экспрессии ErbB3 при помощи малых интерферирующих РНК либо его блокирование моноклональным антителом полностью возвращало чувствительность раковых клеток к ингибиторам тирозинкиназной активности HER2. Таким образом, новые

моноклональные антитела к внеклеточному домену рецептора ErbB3 могут стать важными терапевтическими инструментами регуляции активности рецепторов ErbB.

### **Степень разработанности темы исследования**

Механизмы ErbB3-опосредованной резистентности к анти-EGFR/HER2 моноклональным антителам, ингибиторам тирозинкиназ и гормональной терапии, а также различные подходы к терапевтическому воздействию на данный рецептор были рассмотрены в обзорах [32–35]. Основной стратегией является создание моноклональных антител к внеклеточному домену ErbB3, которые могут заблокировать его в неактивной конформации, помешать связыванию лиганда, препятствовать димеризации с другими рецепторами ErbB, а также вызывать лизис посредством активации системы комплемента и эффекторных клеток. В настоящее время несколько антител находятся в стадии доклинических и клинических исследований, все они связываются с различными эпитопами на рецепторе и, соответственно, обладают уникальными механизмами действия и фармакологическими характеристиками. Элгемтумаб (LJM716) связывается с субдоменами II и IV внеклеточного домена ErbB3 и блокирует рецептор в неактивной конформации, таким образом ингибируя как стимулированную лигандом, так и лиганд-независимую пролиферацию различных клеточных линий рака молочной железы [36]. Лумретузумаб (RG7116) связывается с субдоменом I, блокирует связывание лиганда и тем самым предотвращает фосфорилирование рецептора, а также снижает его поверхностную концентрацию [37]. Другое антитело, KTN3379, ингибирует активацию ErbB3 аллостерически, связываясь с субдоменом III и его линкером с субдоменом II, и как следствие блокируя конформационные изменения необходимые для связывания с лигандом и димеризации [38].

Все приведенные выше разрабатываемые моноклональные антитела к рецептору ErbB3 являются классическими иммуноглобулинами G. В данном исследовании предлагается альтернативный подход, заключающийся в применении неканонических антител верблюдовых. Впервые обнаруженные в сыворотке верблюда [39], данные антитела не имеют СН1 домена тяжелой цепи и полностью лишены легких цепей. Их переменные фрагменты, также называемые однодоменными антителами или нанотелами, представляют собой одиночный иммуноглобулиновый домен молекулярной массой 12–15 кДа. Однодоменные антитела обладают множеством преимуществ, включая высокую растворимость, стабильность и относительную простоту биотехнологического производства [40]. Их генетические и структурные особенности порождают необычный антигенный репертуар с широким спектром эпитопов, отличающихся от классических антител [41; 42]. Многочисленные потенциальные варианты терапевтического применения однодоменных антител были рассмотрены в исчерпывающей обзорной статье [43]. Недавнее одобрение для терапевтического использования первого однодоменного антитела, каплацизумаба [44], использующегося для лечения

приобретённой тромботической тромбоцитопенической пурпуры [45; 46], позволяет рассчитывать, что вскоре молекулы данного типа найдут широкое применение в медицине. На данный момент блокирование функции рецептора ErbB3 при помощи однодоменных антител не было продемонстрировано.

### **Цель и задачи исследования**

Целью данного исследования являлась разработка и структурно-функциональные исследования новых однодоменных антител ламы как перспективных средств для иммунотерапии онкологических заболеваний, основанной на блокировании активации рецептора ErbB3 в опухолевых клетках.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить закономерности амплификации сложных ансамблей фрагментов ДНК при проведении обычной и эмульсионной полимеразной цепной реакции для совершенствования методов конструирования библиотек антител.
2. Разработать эффективную систему гетерологической экспрессии для получения растворимых однодоменных антител высокой степени очистки в нативной конформации.
3. Изучить структурные и биохимические характеристики однодоменных антител к внеклеточному домену рецептора ErbB3.
4. Изучить связывание однодоменных антител с рецептором ErbB3 и их функциональную активность на клеточных линиях рака молочной железы.

### **Методология и методы исследования**

Для решения задач данного исследования были применены различные методы биохимии, молекулярной иммунологии, структурной и клеточной биологии. Для создания отдельных генетических конструкций применялись методы молекулярного клонирования. Анализ генетических последовательностей и клонального разнообразия библиотек проводился при помощи секвенирования следующего поколения. Для получения рекомбинантных однодоменных антител и фрагментов рецептора применялись методы гетерологической экспрессии и различные хроматографические техники. Биохимическая характеристика и исследования стабильности однодоменных антител включали использование методов масс-спектрометрии и спектроскопии собственной флуоресценции белков. Для структурных исследований были применены методы спектроскопии кругового дихроизма, макромолекулярной кристаллографии и молекулярного моделирования. Функциональные исследования однодоменных антител задействовали методы измерения поверхностного плазмонного резонанса, конфокальной флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Предложенная теоретическая модель точно описывает процесс амплификации сложных библиотек ДНК при проведении полимеразной цепной реакции, тем самым создавая теоретическую основу для совершенствования методов конструирования библиотек антител, сохраняющих их клональное разнообразие.
2. Гетерологическая экспрессия в цитоплазме бактерий *E. coli*  $\Delta trxB \Delta gor$  cDsbC в виде химерной конструкции с белком SUMO позволяет более эффективно по сравнению с классической системой периплазматической экспрессии получать однодоменные антитела.
3. Разработанные однодоменные антитела к рецептору ErbB3 обладают высокой термодинамической стабильностью и нативной структурой иммуноглобулинового домена; полученные кристаллические структуры высокого разрешения позволяют изучить конформации гипервариабельных участков и построить модель связывания с эктодоменом рецептора ErbB3.
4. Два разработанных однодоменных антитела неконкурентно связываются с эпитопами на субдоменах I и III эктодомена рецептора ErbB3 с наномолярной аффинностью и эффективно подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию HER2<sup>-</sup> и HER2<sup>+</sup> клеток рака молочной железы как посредством прямой конкуренции с лигандом, так и без нее.

### **Научная новизна полученных результатов**

В результате исследования разработан новый иммунотерапевтический подход к блокированию активации рецептора ErbB3 в опухолевых клетках. Впервые для этой цели созданы особые неканонические антитела верблюдовых, не имеющие легких цепей.

В рамках исследования развиты технологии молекулярной иммунологии для отбора и синтеза однодоменных антител. Впервые продемонстрированы фундаментальные закономерности, определяющие эффективность амплификации и эволюцию клонального разнообразия библиотек. Разработан метод гетерологической экспрессии однодоменных антител в цитоплазме бактерий *E. coli* для эффективного получения фолдированных растворимых однодоменных антител без молекулярных тагов. Показана высокая термодинамическая стабильность созданных однодоменных антител и проанализированы ее структурные детерминанты.

Два полученных антитела являются первыми высокоаффинными ингибирующими однодоменными антителами к внеклеточному домену рецептора ErbB3. Продemonстрировано, что они связываются неконкурентно с двумя эпитопами на рецепторе и блокируют его активацию различными путями, отличающимися от известных моноклональных антител к ErbB3. Оба высокоаффинных однодоменных антитела проявляют функциональную активность и подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию клеток рака молочной железы.



## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Значимость работы обусловлена ее вкладом в развитие ключевых технологий молекулярной иммунологии и в исследования однодоменных антител как нового класса молекул для терапии и диагностики.

Технология библиотек ДНК является важнейшим инструментом отбора антител необходимой специфичности, при этом сохранение клонального разнообразия необходимо для поиска редких функционально активных антител. В данном исследовании была предложена теоретическая модель, предсказывающая эффективность амплификации библиотек при использовании обычной полимеразной цепной реакции и при инкапсуляции библиотеки в капли эмульсии. Данная модель хорошо согласуется с экспериментальными данными и представляет теоретическую основу для анализа эволюции репертуара библиотек и оптимизации протоколов их амплификации и клонирования.

Неканонические антитела верблюдовых обладают уникальными свойствами, которые могут быть реализованы в создании новых иммунотерапевтических средств. Однако их структурно-функциональные характеристики, такие как антигенный репертуар, структуры гипервариабельных участков и молекулярные детерминанты термодинамической стабильности, остаются относительно малоизученными. В данном исследовании получены фундаментальные знания об устройстве и свойствах однодоменных антител. Показано, что консервативная дисульфидная связь в однодоменном антителе может отсутствовать при сохранении фолдинга, высокой стабильности и функции данной молекулы. Полученные структуры высокого разрешения позволили изучить конформации гипервариабельных участков. Структура гипервариабельного участка CDR3 в одном из однодоменных антител отличается от всех известных классов структур для классических иммуноглобулинов G, что демонстрирует различия в репертуарах и механизмах молекулярного узнавания между ними. Сравнительные исследования стабильности однодоменных антител позволили выявить определяющие ее аминокислотные остатки. Исследование также обладает высокой практической значимостью, поскольку разработанные методы получения однодоменных антител являются универсальными и могут быть применены для других молекул данного класса. Разработанные однодоменные антитела, помимо терапевтического применения, могут также быть использованы для визуализации рецептора ErbB3 и диагностики.

## **Личный вклад автора**

Все представленные в диссертации научные результаты получены автором лично. Эксперименты по созданию генетических конструкций, экспрессии и очистке рекомбинантных белков, изучению биохимических характеристик однодоменных антител, макромолекулярной кристаллографии, изучению взаимодействия однодоменных антител с рецептором и оценке их

антипролиферативной активности были проведены автором собственноручно с использованием оборудования лаборатории нанобиотехнологий Алферовского университета. Работа по изучению амплификации библиотек ДНК выполнена в соавторстве с Л. А. Овчинниковой. Л. А. Овчинниковой созданы библиотеки, разработаны методы эмульсификации и подобраны условия амплификации, проведен количественный анализ продуктов; автором проведен анализ данных секвенирования следующего поколения (NGS) для библиотек, изучены ошибки в фрагментах ДНК и построена теоретическая модель, описывающая процесс амплификации. Иммунизация лам и отбор кандидатных антител проводились компанией «Биокад» и в настоящей диссертации подробно не рассматриваются. Публикации по материалам работы были подготовлены совместно с соавторами и научным руководителем.

### **Структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, трех основных глав, заключения и выводов. Общий объем диссертации составляет 147 страниц, включая 31 рисунок и 11 таблиц. Список литературы содержит 261 источник.

### **Апробация работы**

Основные результаты исследования были представлены на ряде конференций и семинаров, в частности: на 4-й международной школе и конференции “Saint Petersburg OPEN 2017” (Санкт-Петербург, 2017 г.); на семинарах в Индустриальном партнере проекта — ЗАО «Биокад» (Санкт-Петербург, 2017 г.); на 42-й научной конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2018 г.); на 5-й международной школе и конференции “Saint Petersburg OPEN 2018” (Санкт-Петербург, 2018 г.); на 6-м всероссийском научном форуме «Наука будущего — наука молодых» (Москва, 2021 г.); на семинаре в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, 2022 г.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных базах данных, 1 патент и 6 тезисов докладов.

#### **Статьи в рецензируемых журналах:**

1. Targeting ErbB3 receptor in cancer with inhibitory antibodies from llama / **I. E. Eliseev**, V. M. Ukrainskaya, A. N. Yudenko [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – № 9. – P. 1106.
2. Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information / S. S. Terekhov, **I. E. Eliseev**, L. A. Ovchinnikova [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117. – № 44. – P. 27300-27306.

3. Cadmium SAD phasing at CuK $\alpha$  wavelength / **I. E. Eliseev**, A. N. Yudenko, V. M. Ukrainskaya, O. B. Chakchir // *F1000Research*. – 2019. – Vol. 8. – P. 84.
4. Crystal structures of a llama VHH antibody BCD090-M2 targeting human ErbB3 receptor / **I. E. Eliseev**, A. N. Yudenko, V. V. Vysochinskaya [et al.] // *F1000Research*. – 2018. – Vol. 7. – P. 57.
5. Thermodynamic analysis of the conformational stability of a single-domain therapeutic antibody / **I. E. Eliseev**, A. N. Yudenko, N. A. Besedina [et al.] // *Technical Physics Letters*. – 2017. – Vol. 43. – № 12. – P. 1088-1091.

#### **Патенты:**

Патент № 2721854 Российская Федерация, МПК C07K 16/22 (2006.01). Однодоменное антитело, специфически связывающее рецептор ErbB3 человека, без канонической дисульфидной связи : № 2018147039 : заявл. 27.12.2018 : опубл. 25.05.2020 / А. Н. Юденко, **И. Е. Елисеев**, В. М. Украинская, О. Б. Чакчир ; заявитель СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова – 4 с. : 4 ил.

#### **Тезисы докладов:**

1. Разработка систем экспрессии и очистки однодоменного анти-ErbB3 антитела из периплазмы и цитоплазмы *E. coli* для структурных исследований / **И. Е. Елисеев**, Н. А. Беседина, А. Н. Юденко [и др.] // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва. — 2017. Acta Naturae (Спецвыпуск). — С. 180.
2. Purification and biophysical characterization of a new single-domain antibody against human HER3 receptor / **I. E. Eliseev**, N. A. Besedina, A. N. Yudenko [et al.] // 4-я международная школа и конференция “Saint Petersburg OPEN 2017”, Санкт-Петербург. — 2017. Сборник тезисов. — С. 244-247.
3. Бактериальная экспрессия однодоменных антител к рецептору ErbB3 / В. М. Украинская, А. Н. Юденко, **И. Е. Елисеев** // 42-я научная конференция с международным участием «Неделя науки СПбПУ», Санкт-Петербург. — 2018. Материалы научной конференции. — С. 101-104.
4. Crystallization and X-ray structural studies of single-domain antibodies / **I. E. Eliseev**, A. N. Yudenko, O. B. Chakchir // 5-я международная школа и конференция “Saint Petersburg OPEN 2018”, Санкт-Петербург. — 2018. Сборник тезисов. — С. 138-139.
5. Phase diagrams of coil-globule transition in single-domain antibodies / A. A. Sakharov, A. N. Yudenko, O. B. Chakchir, **I. E. Eliseev** // 5-я международная школа и конференция “Saint Petersburg OPEN 2018”, Санкт-Петербург. — 2018. Сборник тезисов. — С. 170-171.

6. Однодоменные антитела для блокирования рецептора HER3 при раке молочной железы / **И. Е. Елисеев**, А. Д. Микушина, А. А. Вронская, О. В. Шамова // 3-й Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов и 10-й Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва. — 2021. Научные труды. — Т. 2. — С. 143.

---

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Рецепторы эпидермального фактора роста ErbB1–4: EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4

Начало исследованиям рецепторов эпидермального фактора роста было положено в 1962 г. когда Стэнли Коэн изолировал белок экстракта слюнной железы, способный стимулировать прорезывание зубов и открытие глаз у новорожденных мышей [47]. Обнаружение данного белка, впоследствии названного эпидермальным фактором роста (epidermal growth factor, EGF), стало продолжением предшествовавших исследований Риты Леви-Монтальчини и Стэнли Коэна по идентификации фактора роста нервов. Их работа по ростовым факторам привела к открытию рецепторных тирозинкиназ и регулируемых ими внутриклеточных сигнальных путей и впоследствии была отмечена Нобелевской премией по физиологии и медицине 1986 г. Эпидермальный фактор роста запускает клеточную пролиферацию посредством стимуляции киназной активности соответствующего рецептора, EGFR [48]. EGFR стал первой обнаруженной рецепторной тирозинкиназой и моделью для понимания функций других важнейших клеточных рецепторов, например рецептора инсулина, также осуществляющего фосфорилирование тирозина в ответ на связывание лиганда [49]. Основополагающие работы раннего периода исследований рецепторных тирозинкиназ рассмотрены в обзоре [50]. Секвенирование гена, кодирующего рецептор EGFR [51; 52], обнаружило его гомологию с геном *erbB* вируса эритробластомы птиц [53], что дало современное название генам семейства рецепторов эпидермального фактора роста: *ERBB1*, *ERBB2*, *ERBB3* и *ERBB4*.

Гомология рецептора EGFR (ErbB1) с вирусным онкогеном, его роль в регуляции клеточной пролиферации, а также амплификация и наличие мутантных форм его гена в опухолевых клетках [52] отчетливо продемонстрировали важную роль EGFR в онкогенезе. Вскоре было показано существование второго онкогена семейства ErbB, первоначально обнаруженного в нейробластомах крыс и названного *neu*, который способен к опухолевой трансформации клеток, и гомологичен гену EGFR [54]. Аналог *neu* был идентифицирован в геноме человека и секвенирован [55]. Получивший название HER2 (ErbB2) белок является родственной EGFR рецепторной тирозинкиназой. Амплификация гена HER2 встречается в 30% опухолей молочной железы и является самым сильным прогностическим фактором, коррелирующим с более низкой выживаемостью [56]. Третий представитель семейства, ErbB3 (HER3), характеризуется повышенной экспрессией в клеточных линиях рака молочной железы, однако изначально не был идентифицирован как онкоген и отличается от уже известных рецепторных тирозинкиназ мутациями в каталитическом домене [57; 58]. Четвертый рецептор семейства, ErbB4 (HER4),

демонстрирует гомологию с ErbB3 во внеклеточном лиганд-связывающем домене, но его внутриклеточный каталитический домен ближе к EGFR и HER2 [59].

### 1.1.1 Лиганды рецепторов ErbB

Все известные естественные лиганды рецепторов ErbB являются их агонистами, связываются с внеклеточными доменами рецепторов и аллостерически стимулируют тирозинкиназную активность внутриклеточных доменов [16]. При этом способностью связывать лиганд обладают рецепторы EGFR, ErbB3 и ErbB4, а HER2, по-видимому, не имеет природных агонистов. Условно лиганды рецепторов ErbB можно разделить на две группы. К первой группе относятся семь EGF-подобных молекул: сам EGF, трансформирующий фактор роста- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), гепаринсвязывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF), амфирегулин (AR), бетацеллюлин (BTC), эпирегулин (EPR) и эпиген. Ко второй группе относятся разнообразные лиганды, кодируемые четырьмя генами нейрегулинов *NRG1*, *NRG2*, *NRG3* и *NRG4*.

EGF-подобные лиганды синтезируются в виде крупного трансмембранного белка-прекурсора, который затем процессируется протеазами на поверхности клеток [60]. Зрелые пептидные гормоны имеют небольшой EGF-домен размером около 40 аминокислотных остатков, обладающий шестью консервативными остатками цистеина, формирующими дисульфидные связи в соответствии с паттерном 1–3, 2–4, 5–6. Именно EGF-домен ответственен за связывание лигандов с рецепторами семейства ErbB. Все семь EGF-подобных лигандов являются агонистами EGFR, а три из них, HB-EGF, BTC и EPR, также стимулируют ErbB4.

Из четырех генов нейрегулинов наиболее хорошо изучен *NRG1*. Удивительно, но ген, кодирующий небольшие пептидные гормоны, имеет длину более 1.3 миллионов пар оснований и содержит 19 экзонов и по крайней мере 6 сайтов инициации транскрипции. Сложный альтернативный сплайсинг приводит к формированию более 15 изоформ, регулирующих самые разнообразные физиологические процессы в развитии нервной системы, сердца, молочной железы и мышц [61]. Разнообразные регуляторные функции *NRG1* обуславливают его связь с несколькими заболеваниями. В частности, способность активировать рецептор ErbB3 связана с ролью *NRG1* в патогенезе рака молочной железы. Недавно было показано, что экспрессия *NRG1* увеличивается в ответ на гипергликемию и ведет к прогрессии опухолей [62]. Нейрегулины также подвергаются протеолитическому процессингу и имеют EGF-домен для связывания с ErbB. Действие нейрегулинов лимитировано рецепторами ErbB3 и ErbB4, причем *NRG1* и *NRG2* активируют оба рецептора, а *NRG3* и *NRG4* только ErbB4. В контексте активации рецептора ErbB3 при раке молочной железы наиболее интересны изоформы *NRG1* типа 1, также называемые херегулинами [63].

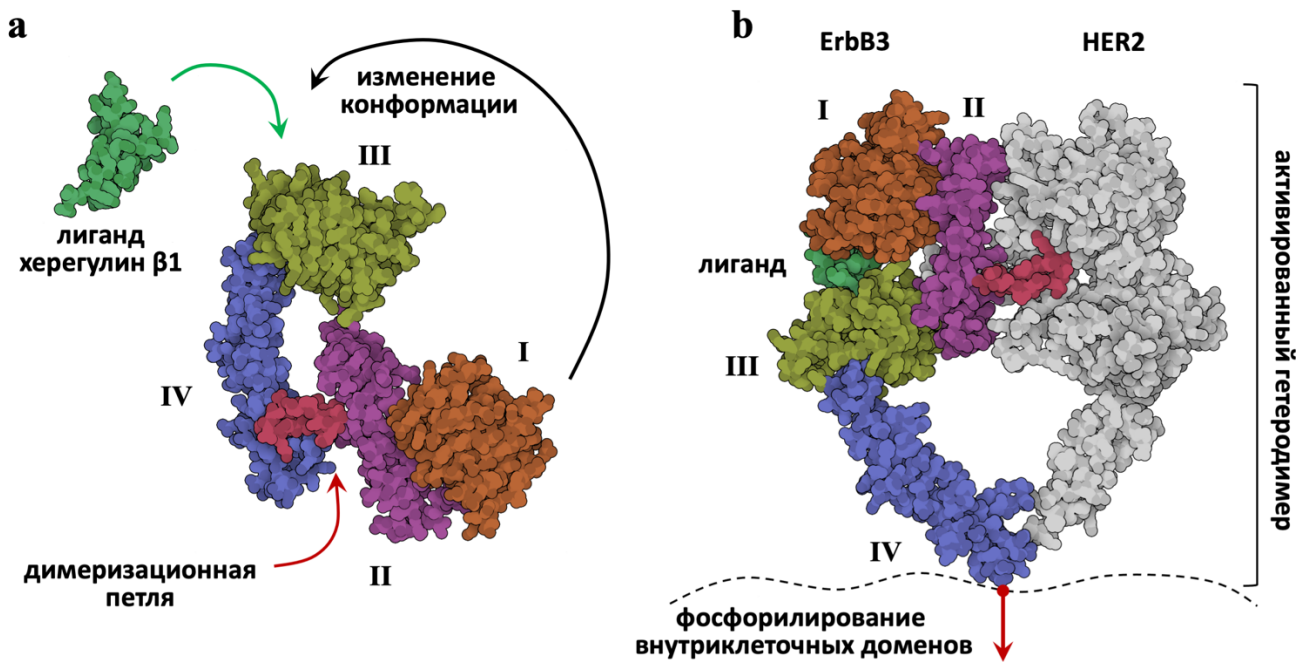
Лиганды не только демонстрируют различную аффинность по отношению к отдельным представителям семейства ErbB, но их аффинность сильно повышается при взаимодействии с рецепторами в составе гетеродимеров с HER2 [64]. Таким образом не имеющий собственных лигандов HER2 является коактиватором других рецепторов ErbB. Аффинность всех, кроме эпирегулина, EGF-подобных лигандов к рецептору EGFR лежит в наномолярном диапазоне [65]. Связывание эпирегулина слабее на два порядка, но при этом он обладает способностью активировать все гетеродимеры ErbB [66]. Среди нейррегулинов наиболее аффинным лигандом является NRG1, а именно изоформа херегулин  $\beta 1$ , который связывается с ErbB3 с наномолярной аффинностью. При действии на гетеродимер HER2:ErbB3 константа связывания херегулина  $\beta 1$  становится пикомолярной [65; 67], что делает его самым аффинным лигандом рецепторов ErbB и единственным сильным активатором ErbB3.

### 1.1.2 Структура рецепторов ErbB

Рецепторы ErbB являются крупными мембранными белками со сложной доменной организацией и множественными сайтами гликозилирования во внеклеточном домене, что делает их структурные исследования чрезвычайно трудной задачей. Секвенирование последовательностей позволило определить доменную организацию рецепторов, одинаковую у всех ErbB. Внеклеточный домен состоит из четырех субдоменов I–IV, имеющих гомологию попарно между собой. N-концевой лейцин-богатый субдомен I гомологичен субдомену III, а цистеин-богатый субдомен II гомологичен субдомену IV [68]. Внеклеточный домен соединяется с внутриклеточной частью трансмембранной спиралью, после которой следует каталитический тирозинкиназный домен и вслед за ним — длинный C-концевой фрагмент, в котором расположены сайты фосфорилирования и присоединения адаптерных белков. До сих пор не получены структуры полноразмерных рецепторов и их димеров, которые могли бы сформировать полную картину механизма их активации — от связывания лиганда до аллостерической активации и фосфорилирования внутриклеточного домена. Однако два десятилетия структурных исследований ErbB позволили получить ряд ключевых структур, объясняющих отдельные элементы эти процессов.

Первым исследованием, позволившем понять архитектуру рецепторов ErbB, стала кристаллизация внеклеточного домена ErbB3 и расшифровка его пространственной структуры высокого разрешения методом макромолекулярной кристаллографии [69]. Кристалл ErbB3 был получен в отсутствие лиганда и позволил изучить конформацию рецептора в неактивном состоянии, изображенную на рисунке 1а (на рисунке изображена аналогичная, но более поздняя структура PDB: 4LEO). Было обнаружено, что субдомен II имеет структурированную в виде  $\beta$ -

шпильки петлю длиной около 20 Å, которая формирует устойчивый контакт с субдоменом IV посредством образования нескольких водородных связей и солевых мостиков. При этом потенциальные сайты связывания лиганда на субдоменах I и III находятся на значительном расстоянии, около 60 Å, что существенно превышает размеры EGF-домена. Таким образом, расшифрованная структура внеклеточного домена ErbB3 показывает, что в отсутствие лиганда он находится в связанном, аутоингибированном состоянии, а присоединение лиганда требует значительной конформационной перестройки.



**Рисунок 1** — Архитектура внеклеточного домена рецепторов ErbB. **(а)** Структура внеклеточного домена рецептора ErbB3 в отсутствие лиганда. Контакт субдоменов II и IV через петлю со структурой  $\beta$ -шпильки стабилизирует аутоингибированную конформацию. Изображена структура PDB: 4LEO. **(б)** Структура активированного гетеродимера внеклеточных доменов ErbB3 и HER2 (S310F) в комплексе с молекулой херегулина  $\beta 1$ . Лиганд связывается с субдоменами I и III. Контакт рецепторов обеспечивается как раз той димеризационной петлей субдомена II, которая поддерживает аутоингибированную конформацию в отсутствие лиганда. Изображена структура PDB: 7MN6.

Практически одновременно со структурой ErbB3 были получены две структуры гомодимеров внеклеточного домена EGFR с лигандами TGF $\alpha$  [70] и EGF [71]. Данные работы позволили точно определить сайты связывания лигандов и продвинуться в понимании механизма димеризации рецепторов. Обе полученные структуры демонстрируют глобальную конформационную перестройку рецептора при связывании с лигандами, в результате которой субдомены I и III приближаются на расстояние, достаточное чтобы взаимодействовать с EGF с двух сторон.



Вследствие этого субдомен II теряет контакт с субдоменом IV, а  $\beta$ -шпилька субдомена II, «димеризационная петля», связывается с субдоменом II противоположного рецептора, тем самым стабилизируя димер. Структура внеклеточного домена HER2 [72] похожа на рецептор EGFR в составе гомодимера после связывания лиганда. В HER2, замены консервативных аминокислотных остатков в субдомене IV нарушают контакт с субдоменом II, а субдомены I и III формируют контакт напрямую, без связывания лиганда. Структурные данные демонстрируют отсутствие у HER2 классической аутоингибированной конформации наподобие других ErbB и объясняют его роль как эффективного коактиватора других рецепторов, не требующего лигандов. С другой стороны, рецептор HER2 не формирует стабильных гомодимеров. Одно из объяснений этого парадокса заключается в том, что HER2 на самом деле находится в аутоингибированном состоянии, которое структурно отличается от аутоингибированных конформаций других ErbB и больше похоже на их активированные формы. Данное объяснение основано на сходстве структуры HER2 со структурой EGFR дрозофилы, который находится в аутоингибированном состоянии и имеет активирующие лиганды [73].

Недавно в результате реконструкции данных электронной криомикроскопии была получена первая пространственная структура высокого разрешения для гетеродимера полноразмерных рецепторов HER2 и ErbB3 в комплексе с одной молекулой херегулина  $\beta 1$ , которая изображена на рисунке 1b [74]. Кроме того, что полученная модель впервые раскрывает устройство гетеродимера ErbB, она также является первым структурным исследованием ErbB3 в комплексе с лигандом. Удивительно, но в отличие от симметричных гомодимеров EGFR [70; 71] и ErbB4 [75], в гетеродимере HER2:ErbB3 только димеризационная петля HER2 формирует стабильный контакт с противоположным рецептором. Происходящий при связывании лиганда с ErbB3 поворот субдоменов I и III друг относительно друга формирует карман для связывания димеризационной петли HER2. В свою очередь не имеющий лигандов HER2 не формирует подходящего сайта связывания для димеризационной петли ErbB3. Таким образом, HER2 находится в конститутивно активированном состоянии как донор димеризационной петли, но при этом аутоингибирован как ее акцептор. Мутация S310F в HER2 придает ему способность стабилизировать димеризационную петлю ErbB3. Структура другого гетеродимера, EGFR:HER2, также недавно полученная при помощи электронной криомикроскопии, подтверждает эту модель [76].

### 1.1.3 Механизм активации рецепторов ErbB

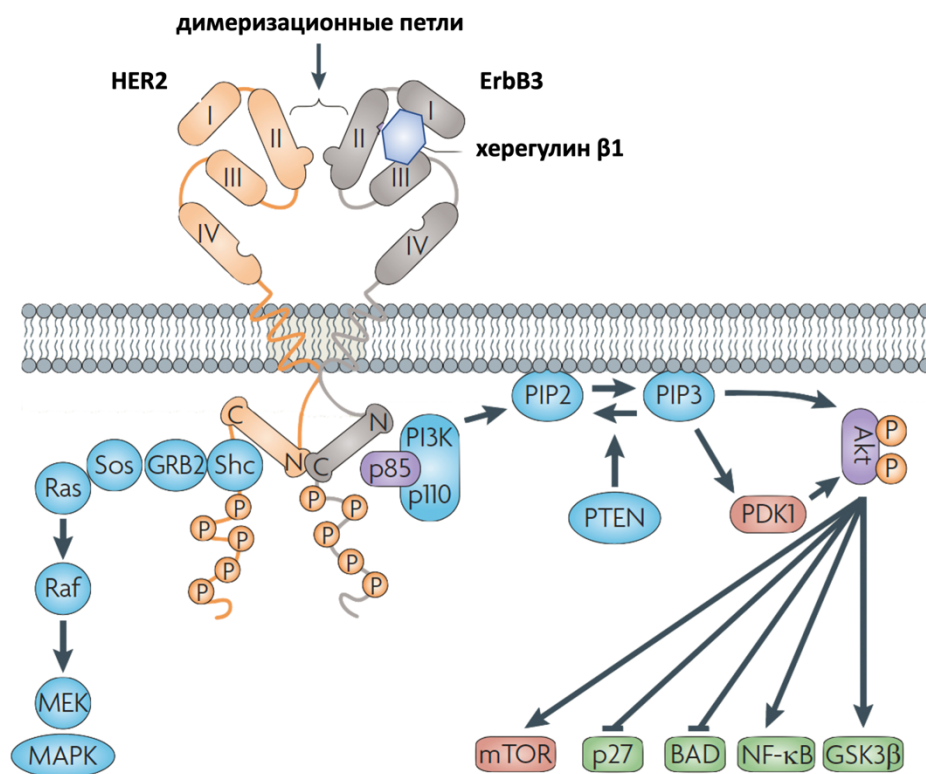
Рецепторы ErbB и их лиганды участвуют в эндокринной, паракринной, юкстакринной и аутокринной регуляции. Классическим примером эндокринной регуляции является стимуляция

роста зубов и открытия глаз у мышей посредством EGF, который синтезируется специализированными клетками слюнной железы [47]. Возможно самой распространенной для ErbB является паракринная форма сигнализации, обеспечивающая коммуникацию близлежащих клеток через диффузию гормонов. В пользу этого говорит тот факт, что большинство ростовых факторов были идентифицированы как растворимые белки в кондиционированных средах [61], а также многие исследования развития органов и тканей, например молочной железы [77]. Лиганды могут оставаться ассоциированными с клеточной мембраной и реализовывать юкстакринную активацию при прямом контакте соседних клеток, что было показано для HB-EGF [78] и нейрегулинов [61; 79]. Рецепторы ErbB также часто активируются по аутокринному механизму, когда лиганд синтезируется той же клеткой, на которой расположен рецептор. Аутокринная стимуляция HER2 и ErbB3 тесно связана с развитием опухолей, и наблюдается при раке молочной железы [80; 81], яичников [82] и легкого [83].

Активация рецепторов ErbB начинается со связывания лигандов (рисунок 2), которые индуцируют димеризацию внеклеточных доменов [15; 16; 84; 85]. Приведенные выше структуры рецепторов ErbB и их димеров позволили построить стандартную модель их димеризации [86]. В соответствии с этой моделью рецепторы EGFR, ErbB3 и ErbB4 в отсутствие лиганда находятся в аутоингибированной конформации, стабилизированной взаимодействием димеризационной петли субдомена II с субдоменом IV. Связывание лигандов с субдоменами I и III нарушает аутоингибированную конформацию и приводит к высвобождению димеризационных петель, которые формируют контакт с противоположным рецептором. Рецептор HER2 не находится в аналогичной другим ErbB аутоингибированной форме, и его димеризационная петля постоянно экспонирована для взаимодействия. Помимо структурных данных, полученных для реконструированных *in vitro* димеров, ассоциация одиночных рецепторов EGFR *in vivo* на мембранах живых клеток после стимуляции лигандом EGF была визуализирована при помощи микроскопии [87]. Димеры рецепторов ErbB также изучались при помощи спектроскопии одиночных молекул *in vitro*. Одиночные гетеродимеры HER2:ErbB3, выделенные из клеток при помощи иммунопреципитации, стабильны и способны эффективно фосфорилировать множественные сайты на С-конце ErbB3 и одновременно связывать несколько адаптерных белков [88].

Стандартная модель димеризации рецепторов ErbB [86] не описывает некоторые важные биологические функции, в частности способность разных лигандов стимулировать отличающиеся паттерны фосфорилирования С-концевого фрагмента и, соответственно, индуцировать разный биологический отклик [89], отсутствие стабильных гомодимеров HER2 и негативную кооперативность при связывании лиганда [90]. Исследования асимметрии димеров рецепторов ErbB стали путем к более полному пониманию механизма их активации.

Структурные исследования EGFR дрозофилы продемонстрировали, что связывание молекулы лиганда с одним рецептором димера накладывает конформационные ограничения на сайт связывания во втором рецепторе, тем самым уменьшая аффинность для присоединения второго лиганда [91]. В функциональных исследованиях было продемонстрировано, что присоединение одного лиганда с формированием асимметричных гомодимеров EGFR или ErbB4 достаточно для активации внутриклеточной киназной активности [75]. В другом ключевом структурно-функциональном исследовании комплексов EGFR с эпирегулином было показано, что даже в случае присоединения двух одинаковых молекул лиганда может формироваться асимметричный гомодимер [92]. Также было продемонстрировано, что различные лиганды формируют димеры разной структуры, стабильности и асимметрии, что влияет на кинетику фосфорилирования внутриклеточного домена и биологический отклик. Асимметрия является основной характеристикой недавно полученных структур гетеродимеров с HER2 [74; 76]. Гетеродимеры HER2:ErbB3 обладают большой конформационной пластичностью, что делает блокирование их активации крайне сложной задачей [93].



**Рисунок 2** — Механизм активации и сигнальные пути рецептора ErbB3. Присоединение лиганда ведет к образованию гетеродимеров HER2:ErbB3. Фосфорилирование внутриклеточного домена активирует сигнальный путь пролиферации Ras-MAPK и антиапоптотический путь PI3K-Akt. Цитируется с изменениями по [94].

Результатом связывания лиганда и димеризации рецепторов становится аллостерическая активация внутриклеточных киназных доменов и фосфорилирование С-концевых фрагментов.

При этом ErbB3 имеет несколько замен среди консервативных аминокислотных остатков в каталитическом центре киназного домена, которые отличают его от других рецепторов семейства [58]. Ранние эксперименты с ErbB3 показали отсутствие тирозинкиназной активности [22], что поставило вопрос о его функциональной роли. Позднее было установлено что ErbB3 все таки способен связывать молекулу АТФ и аутофосфорилировать С-концевой фрагмент, но с меньшей активностью, чем другие ErbB киназы [95]. По-видимому, остаточная активность киназы ErbB3 не играет существенной роли в клеточной сигнализации [96]. Роль ErbB3 и то, почему внутриклеточные домены ErbB не осуществляют фосфорилирование субстратов до димеризации рецепторов, стали ясны из кристаллических структур гомодимеров киназных доменов EGFR и исследований их мутантов [97]. Оказалось, что внутриклеточный киназный домен находится в аутоингибированном состоянии, в котором активационная петля блокирует доступ субстрата к каталитическому центру. Два киназных домена EGFR формируют асимметричный димер, в котором один каталитически неактивный мономер аллостерически меняет конформацию активационной петли во втором мономере и тем самым активирует его. Активация тирозинкиназ ErbB путем снятия аутоингибирования активационной петлей при формировании асимметричных димеров родственна механизму активации циклинзависимых киназ при связывании с циклинами. Данный механизм подтверждается структурой гетеродимера тирозинкиназных доменов EGFR и ErbB3, в котором ErbB3 является активатором для EGFR [98].

Дальнейшая сигнализация определяется присоединением различных адаптерных белков к фосфорилированным С-концевым фрагментам рецепторов [84]. Два основных сигнальных пути, активируемых гетеродимерами HER2:ErbB3, представлены на рисунке 2. Оба рецептора имеют несколько основных сайтов фосфорилирования тирозина в С-концевых фрагментах, каждый из которых может связывать белки со специализированным SH2 доменом. Путь пролиферации, или Ras-МАРК, задействуется присоединением адаптера Shc к фосфотирозинам на С-конце HER2, причем единственный основной сайт (Y1253) достаточен для онкогенного трансформирующего действия данного рецептора [28]. Каскад активации Ras-МАРК задействует множество нижележащих киназ, что в итоге ведет к прогрессии клеточного цикла. Шесть сайтов фосфорилирования ErbB3 обеспечивают связывание адаптерного белка p85, который затем активирует PI3K, что запускает сигнализацию по антиапоптотическому пути PI3K-Akt [29]. Akt фосфорилирует множество других регуляторов, ингибируя апоптотические каскады, индуцируемые p53, p73 и инициаторными каспазами. Два упомянутых выше сигнальных пути представляют только малую долю активируемых ErbB процессов. ErbB также играют важную роль в миграции и инвазии раковых клеток [99] и формировании опухолевого микроокружения для модуляции иммунного ответа организма [100]. Сложная сигнальная сеть рецепторов ErbB характеризуется разнообразием входных сигналов и эффекторных функций,

взаимозаменяемостью различных компонентов и множеством цепей обратной связи, обеспечивающими ее устойчивость [15]. Обратной стороной устойчивости сигнальной сети рецепторов ErbB является сложность ее эффективного терапевтического блокирования при патологической активации вследствие определенных молекулярных нарушений.

## 1.2 Функции рецепторов ErbB и их роль в норме и патологии

### 1.2.1 Функции рецепторов ErbB и их лигандов в норме

Большая часть информации о нормальных физиологических функциях ErbB была получена в экспериментах по изучению развития и фенотипов животных с нокаутами генов рецепторов и их лигандов. В зависимости от генетических особенностей конкретной линии, мыши с нокаутом гена EGFR умирают в середине беременности из-за дефекта плаценты, либо в первые три дня жизни из-за множественных дефектов кожи, почек, печени, мозга и пищеварительного тракта [101]. Наблюдаемые фенотипические особенности демонстрируют ключевые функции EGFR в развитии эпителия. Удивительно, но лиганды EGFR, а именно AR, EGF и TGF $\alpha$ , не являются жизненно важными белками. Даже одновременный нокаут генов трех приведенных лигандов не влечет за собой формирования летального фенотипа и выражается в умеренных дефектах развития молочной железы [102]. По-видимому, существование семи различных EGF-подобных лигандов рецептора EGFR обеспечивает высокую взаимозаменяемость и устойчивость сигнализации через EGFR в нормальной физиологии.

Противоположная ситуация наблюдается с основным лигандом рецепторов ErbB3 и ErbB4, нейрегулином 1, который жизненно важен при эмбриогенезе. Нокаут *NRG1* у мышей ведет к нарушениям эмбриогенеза и гибели эмбрионов из-за дефектов развития сердца [103]. Помимо этого, в развитии нервной системы нокаут *NRG1* приводит к нарушению дифференцировки прекурсоров шванновских клеток. Остальные нейрегулины, NRG 2, 3 и 4, не являются жизненно необходимыми, но их нокаут вызывает дефекты у взрослых мышей. Так, нокаут NRG2 ведет к снижению размера особей и их фертильности [104]. Гены рецепторов HER2 и ErbB4 являются жизненно важными и их нокаут приводит к летальному фенотипу, аналогичному NRG1<sup>-</sup> [105; 106]. Рецептор ErbB3 также является жизненно важным. Фенотип при нокауте ErbB3 отличается от NRG1<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>, и ErbB4<sup>-</sup>, но также характеризуется дефектами в развитии сердца и нервной системы, которые ведут к смерти эмбрионов на более позднем сроке [107]. Таким образом, исследования животных с нокаутами генов ErbB показали абсолютную необходимость каждого рецептора для формирования сердца, нервной системы и эпителиальных органов. С другой стороны, летальный фенотип затрудняет детальные исследования физиологических функций рецепторов во взрослых особях генетическими методами.

Молочная железа является тем органом, где нарушения регуляции рецепторов ErbB наиболее часто приводят к развитию рака, в связи с чем интересны их нормальные физиологические функции. Детальное исследование уровней мРНК и белков в молочной железе мыши показало, что все четыре рецептора ErbB экспрессируются в эпителии молочной железы совместно с EGF-подобными лигандами и NRG1 [108]. Также для всех рецепторов детектировалось фосфорилирование тирозинов в С-концевом фрагменте, которое синхронно усиливалось в период лактации и соответствовало пику концентрации EGF. Экспрессия лигандов EGFR в свою очередь регулируется уровнем эстрогена, что было убедительно показано для амфирегулина [109]. Таким образом, рецепторы ErbB и их лиганды по-видимому являются паракринными медиаторами действия системных гормонов в тканях молочной железы [109; 110].

Роль рецепторов ErbB в физиологии сердца не ограничивается периодом эмбрионального развития. Внимание к этому привлекла кардиотоксичность, часто наблюдаемая при таргетном блокировании HER2 трастузумабом [111]. Функции рецепторов ErbB и NRG1 в сердце и их потенциальное терапевтическое значение при сердечной недостаточности рассмотрены в обзоре [112]. На клеточном уровне эффекты NRG1 и ErbB связаны со стимуляцией пролиферации и выживания кардиомиоцитов. Было показано, что NRG1 синтезируется клетками эндотелия в ответ на окислительный стресс и защищает кардиомиоциты от апоптоза через активацию ErbB4 и затем Akt [113]. На уровне организма NRG1 участвует в нейрогормональной регуляции сердца. NRG1 снижает силу сокращений сердечной мышцы при воздействии агонистов  $\beta$ -адренорецептора, действуя аналогично м-холинорецепторам [114]. Таким образом NRG1 снижает сердечный выброс и кровяное давление. Вероятно, секреция NRG1 клетками эндотелия регулируется в ответ на уровни циркулирующих эпинефрина и ангиотензина II для поддержания нормального давления и сердечного ритма [112]. Функции и механизм действия ErbB в сердце еще относительно малоизучены, но приведенные данные свидетельствуют, что некоторые из этих функций могут быть связаны с локальной паракринной регуляцией в ответ на системные гормоны, как это наблюдается в молочной железе.

В нервной системе сигнализация через рецептор ErbB3 посредством различных изоформ NRG1 регулирует дифференциацию шванновских клеток и формирование миелиновой оболочки аксонов [115]. При этом сигнальная сеть ErbB важна не только при развитии нервной системы, но и для ее регенерации после травмы у взрослого организма. Было показано, что спонтанная ремиелинизация аксонов центральной нервной системы после повреждения спинного мозга регулируются NRG1 и осуществляется шванновскими клетками, которые обычно специфичны для периферической нервной системы [116]. Эти шванновские клетки в центральной нервной системе образуются в результате дифференцировки олигодендроцитарных клеток-предшественников, которая управляется NRG1 через сигнальную сеть ErbB [117].

Нормальные физиологические функции рецепторов ErbB и их лигандов оказались не столь заметны на фоне их онкогенных свойств. Тем не менее ErbB управляют ключевыми процессами в развитии, функционировании и регенерации различных органов и тканей и потенциально могут иметь терапевтическое значение не только в онкологии.

### 1.2.2 Рецепторы EGFR и HER2 как классические онкогены

Определение последовательностей рецепторных тирозинкиназ EGFR и HER2 и выявление их связи с вирусным онкогеном *v-erbB* и онкогеном нейробластом крыс *neu* сразу поставило вопрос об их роли в процессах развития рака [51; 52; 54; 55]. Вскоре появились результаты многочисленных клинических исследований, связывающие дерегуляцию сигнальной сети ErbB с прогрессией опухолей различной локализации.

Первое такое исследование показало, что ген HER2 амплифицирован в 30% исследованных первичных опухолей молочной железы, что коррелировало со значительно более низкой выживаемостью [56]. Тщательный количественный анализ рецептора HER2 в опухолях молочной железы при помощи иммуногистохимического окрашивания с радиоактивной меткой показал, что повышенная экспрессия HER2 наблюдается в 85% опухолей, а уровень экспрессии может достигать 480-кратного превышения над нормой [118]. Основанная на паттернах экспрессии множества генов молекулярная классификация рака молочной железы также выделяет опухоли с гиперэкспрессией HER2 в отдельную группу [119]. Помимо рака молочной железы, где рецептор HER2 является главным прогностическим маркером, его повышенная экспрессия также обнаруживается и коррелирует с худшим прогнозом в других солидных опухолях, в частности при раке желудка [120], прямой кишки [121], немелкоклеточном раке легкого [122].

Наряду с HER2, рецептор EGFR также является классическим онкогеном. Экспрессия EGFR коррелирует с неблагоприятным прогнозом при раке головы и шеи, яичников, матки, мочевого пузыря [123]. При раке молочной железы, желудка, эндометрия и колоректальном раке экспрессия EGFR часто повышена, но влияние на прогноз не так однозначно выражено. Например, при колоректальном раке EGFR гиперэкспрессирован в 80% случаев, но при этом не является прогностическим маркером общей выживаемости [124]. При этом первое терапевтическое антитело к EGFR, цетуксимаб, показало свою эффективность как раз в случае колоректального рака с повышенной экспрессией EGFR [19; 125]. Удивительно, но цетуксимаб демонстрирует эффективность даже у тех пациентов с колоректальным раком, где экспрессия EGFR в опухоли не обнаруживается при помощи иммуноцитохимии [126]. При немелкоклеточном раке легкого мутации в тирозинкиназном домене EGFR являются драйверами

развития заболевания и обуславливают хороший отклик таких пациентов на анти-EGFR терапию [127].

Несколько разных механизмов ответственны за конститутивную активацию рецепторов EGFR и HER2, которая превращает их из жизненно важных регуляторов нормальных процессов в мощные онкогены. Лиганд-независимая конститутивная активация EGFR может быть следствием амплификации его гена, точечных мутаций во внутриклеточном домене и более крупных делеций во внеклеточном домене [128]. При немелкоклеточном раке легкого, активирующие точечные мутации в тирозинкиназном домене EGFR [127] и амплификация гена EGFR ведут к усилению димеризации и фосфорилирования внутриклеточных доменов [129]. Крупные делеции во внеклеточном домене ведут к образованию форм рецептора, которые не управляются лигандами, но при этом обладают остаточной способностью к спонтанной активации. Примером является EGFRvIII в котором отсутствуют субдомены I и II внеклеточного домена, и соответственно нарушены все этапы нормальной сигнализации: нет аутоингибирования, связывания с лигандами и димеризации через субдомен II. При этом EGFRvIII характеризуется существенным уровнем фосфорилирования и встречается в более чем половине глиобластом [130]. Другим механизмом конститутивной активации является аутокринная стимуляция лигандом. Одним из примеров аутокринного цикла активации является формирование резистентности к лапатинибу в HER2<sup>+</sup> опухолях молочной железы, когда опухолевые клетки переходят от активации через димеры HER2:ErbB3 к экспрессии херегулина и активации димеров EGFR:ErbB3, т.к. EGFR хуже ингибируется лапатинибом [81]. В случае рецептора HER2 конститутивная активация чаще всего является следствием амплификации его гена и гиперэкспрессии. Альтернативным механизмом активации, аналогично рецептору EGFR, являются активирующие мутации в тирозинкиназном домене, найденные у пациентов с раком молочной железы без амплификации HER2 [131].

Признаки рака, сформулированные Ханаханом и Вайнбергом [132], включают шесть биологических свойств опухолей: отсутствие необходимости во внешних ростовых сигналах, нечувствительность к антипролиферативным сигналам, инвазия в ткани и формирование метастаз, неограниченный репликативный потенциал, поддержка ангиогенеза и избегание апоптоза. Онкогены EGFR и HER2 участвуют в формировании сразу нескольких из этих свойств. Конститутивная активация рецепторов ведет к стимуляции пролиферации клеток через сигнальный путь Ras-МАРК и определяет отсутствие необходимости во внешних ростовых сигналах. Активация пути PI3K-Akt обуславливает избегание апоптоза опухолевыми клетками. Рецепторы EGFR и HER2 модулируют взаимодействие с внеклеточным матриксом и обеспечивают миграцию и инвазию опухолевых клеток [99]. Они также стимулируют ангиогенез [133] и участвуют в формировании специфического опухолевого микроокружения



для того чтобы избежать иммунного ответа организма [100]. Изучение рецепторов EGFR и HER2 как классических онкогенов позволило продвинуться в понимании молекулярных, клеточных и физиологических функций рецепторных тирозинкиназ в развитии заболеваний человека.

### **1.3 Проблема резистентности опухолей к блокированию HER2 и роль рецептора ErbB3 в ее формировании**

Выше были рассмотрены общие для рецепторов EGFR и HER2 структурно-функциональные характеристики и роли в онкогенезе. Далее в фокусе исследования будут находиться рецепторы HER2 и ErbB3 и их взаимодействие при терапии рака молочной железы. Внедрение новых стандартов лечения HER2<sup>+</sup> рака молочной железы, основанных на таргетном блокировании рецептора при помощи моноклональных антител и ингибиторов тирозинкиназ, привело к невероятному улучшению прогноза этого тяжелейшего заболевания [21]. В частности, при адьювантной терапии моноклональными антителами раннего HER2<sup>+</sup> рака молочной железы трехлетняя выживаемость без инвазивного заболевания составляет 94% [134]. Однако одновременно с совершенствованием анти-HER2 таргетных препаратов выявляются все новые механизмы резистентности опухолей, не позволяющие достичь полного излечения. Частым механизмом резистентности являются активирующие мутации в каталитическом домене, что наблюдается в случае тирозинкиназного ингибитора лапатиниба [135]. В опухолевых клетках также встречается p95, каталитически активная форма HER2, полностью лишенная внеклеточного домена в результате протеолиза или сбоя инициации трансляции, что естественно делает моноклональные антитела неэффективными [136]. Помимо изменений в самом HER2, резистентность связана с активацией различных компенсаторных путей внутри раковой клетки. Особенно часто обеспечивающие резистентность мутации связаны с активацией пути PI3K-Akt. Мутации в *PIK3CA*, кодирующем каталитический домен PI3K, имеются у вплоть до половины опухолей молочной железы и коррелируют с более низкой эффективностью терапии [137]. Аналогичный эффект наблюдается при гиперактивации пути PI3K-Akt из-за потери экспрессии супрессора *PTEN* [138].

Долгое время рецептор ErbB3 не рассматривался в качестве терапевтической мишени ввиду отсутствия у него существенной тирозинкиназной активности. Однако ErbB3 является незаменимым партнером HER2 в процессе опухолевой трансформации, и направленное подавление экспрессии каждого из этих рецепторов одинаково сказывается на пролиферации раковых клеток [27]. Гетеродимеризация ErbB3 с HER2 существенно повышает аффинность рецептора ErbB3 к его природным лигандам [65]. При этом HER2, нуждающийся в гетеродимеризации для полноценной активации, преимущественно димеризуется как раз с

ErbB3. Аналогично, главным димеризационным партнером ErbB3 является HER2, а комплекс HER2:ErbB3 имеет самое высокое фосфорилирование среди всех ErbB [139]. При онкогенезе высокая активность данного гетеродимера усугубляется его способностью активировать широкий спектр сигнальных путей за счет разной специфичности С-концевых фрагментов HER2 и ErbB3.

Одним из механизмов резистентности опухолей к анти-HER2 терапии является задействование связанных с ErbB3 компенсаторных путей. В ключевом исследовании причин неэффективности ингибиторов тирозинкиназ при HER2<sup>+</sup> раке было показано, что их воздействие на клетки приводит к повышению экспрессии рецептора ErbB3 через опосредованную Akt цепь обратной связи [30]. Увеличение концентрации мембранного ErbB3 сдвигает равновесие в ассоциации рецепторов, а остаточной активности HER2 хватает для фосфорилирования и запуска внутриклеточных сигнальных путей, прежде всего того же PI3K-Akt. Подавление экспрессии ErbB3 при помощи РНК интерференции отключает эту цепь обратной связи и возвращает апоптотическое действие ингибиторов тирозинкиназ, которые в противном случае действуют как цитостатики [30]. Данное открытие было впоследствии подтверждено в других экспериментах, где было показано что резистентность также может быть преодолена путем фармакологического блокирования ErbB3 моноклональным антителом к его внеклеточному домену [31]. Механизм резистентности через активацию ErbB3 с последующим задействованием пути PI3K-Akt, по-видимому, является общим для сигнальной сети ErbB и также наблюдается при ингибировании EGFR [140].

ErbB3 также может участвовать в формировании резистентности к терапии за счет активирующих мутаций, влияющих на взаимодействие с HER2. Ряд мутаций во внеклеточном домене ErbB3 усиливает гетеродимеризацию с HER2 и придает раковым клеткам резистентность к лапатинибу [141]. Структурные данные демонстрируют, что две мутации в тирозинкиназном домене ErbB3 стабилизируют взаимодействие с околочембранным фрагментом HER2 и тем самым усиливают аллостерическую активацию и фосфорилирование в гетеродимерах [98]. Недавно было обнаружено, что некоторые мутации одновременно в обоих тирозинкиназных доменах HER2 и ErbB3 проявляют кооперативность и могут стимулировать лиганд-независимую активацию гетеродимеров, усиливать рост и инвазию раковых клеток и обеспечивать резистентность к ингибиторам HER2 [142]. Выявление роли рецептора ErbB3 как главного партнера HER2 в основных сигнальных путях опухолевой клетки, обеспечивающих пролиферацию, выживаемость и резистентность к терапии, стимулировало разработку фармакологических подходов для его блокирования [32]. В отличие от других рецепторов ErbB, отсутствие каталитической активности у ErbB3 затрудняет воздействие на внутриклеточный домен при помощи низкомолекулярных ингибиторов. Естественной мишенью является

внечелочный домен рецептора, который может быть заблокирован при помощи моноклональных антител [35].

## 1.4 Фармакологическое блокирование рецепторов HER2 и ErbB3

### 1.4.1 Моноклональные антитела к рецептору HER2

Первым терапевтическим антителом против рецепторов ErbB стал трастузумаб (герцептин®). Трастузумаб был получен из первоначального отобранного мышинового антитела путем гуманизации [143]. В процессе гуманизации участки, кодирующие константные фрагменты и каркасные области переменных фрагментов мышинового антитела, были заменены на соответствующие человеческие последовательности. В результате было получено антитело подтипа IgG1 с κ-легкой цепью, которое не вызывает существенной иммунной реакции и может задействовать эффекторные функции Fc фрагмента, например антителозависимую клеточную цитотоксичность. В 1998 году трастузумаб стал первым антителом, одобренным FDA для терапии солидных опухолей. При HER2<sup>+</sup> раке молочной железы он и по сей день является основой таргетной терапии, и демонстрирует высокую эффективность при использовании в виде адьюванта к химиотерапии [21]. Эпитоп трастузумаба расположен на субдомене IV, его связывание является высокоаффинным ( $K_D \sim 1$  нМ), но конечно уступает более современным моноклональным антителам с пиколярными константами диссоциации. Механизмы действия трастузумаба разнообразны, и включают блокирование димеризации рецепторов, усиление их эндоцитоза с последующей деградацией, и подавление протеолитического отщепления внечелочного домена [144]. Во многих работах из области моноклональных антител основной акцент делается на молекулярных механизмах блокирования димеризации. Тем не менее терапевтическое действие трастузумаба все же в большей степени связано с эффекторными функциями Fc-фрагмента и задействованием антителозависимой клеточной цитотоксичности. Одним из убедительных доказательств этого является отсутствие противоопухолевого действия в экспериментах на животных, не имеющих Fc рецепторов на эффекторных клетках [10].

Несмотря на неоспоримую терапевтическую пользу трастузумаба как адьюванта при химиотерапии, его применение в одиночку не обладает столь же высокой эффективностью. Одной из гипотез, почему активность трастузумаба в HER2-зависимом раке лимитирована, является недостаточно эффективное блокирование димеризации. Эпитоп трастузумаба, субдомен IV, не участвует напрямую в димеризации, и конформационная пластичность рецепторов по-видимому допускает активацию даже при связанном антителе, как видно из недавней структуры гетеродимера HER2:ErbB3 в комплексе с трастузумабом [74]. Таким образом, трастузумаб не реализует в полной мере потенциал блокирования гетеродимеризации

HER2 при помощи антител. Первым антителом, являющимся настоящим ингибитором димеризации ErbB, стал пертузумаб (перьета<sup>®</sup>), который связывается с субдоменом II и димеризационной петлей рецептора и тем самым полностью стерически блокирует димеризацию. Очевидным путем увеличения эффективности является воздействие сразу на два эпитопа HER2, и синергия трастузумаба и пертузумаба действительно вскоре была показана *in vitro* на клеточных линиях рака молочной железы [145]. Синергия в действии трастузумаба и пертузумаба затем была подтверждена в клинических испытаниях при применении в качестве адьювантов с химиотерапией, где добавление пертузумаба вело к очевидному улучшению выживаемости [146]. Комбинация этих двух антител с химиотерапией в настоящее время является стандартным лечением HER2<sup>+</sup> рака молочной железы и существенно улучшает прогноз.

Другим путем разработки моноклональных антител к HER2, помимо поиска новых путей воздействия на внеклеточный домен для блокирования механизма активации, является оптимизация эффекторных функций Fc фрагмента. Антитело маргетуксимаб (маргенза<sup>®</sup>) связывается с тем же эпитопом на субдомене IV что и трастузумаб, но имеет измененный Fc фрагмент. Его Fc фрагмент имеет повышенную аффинность к активирующему Fcγ рецептору CD16A и пониженную аффинность к ингибирующему Fcγ рецептору CD32B, что позволяет эффективнее задействовать натуральные киллеры. В клинических исследованиях терапия маргетуксимабом ведет к большей выживаемости по сравнению с трастузумабом [147]. В связи с этим в 2020 году маргетуксимаб был одобрен FDA для лечения метастатического рака молочной железы и пополнил арсенал анти-HER2 средств.

### **Биспецифические (бипаратопные) антитела к рецептору HER2**

Эффективность комбинации моноклональных антител к разным эпитопам внеклеточного домена HER2 стимулировала исследования инженерии антител для объединения двух различных переменных фрагментов в одной молекуле IgG. В настоящее время биспецифические антитела являются одной из самых бурно развивающихся областей разработки иммунотерапевтических средств, и существует множество комбинаций потенциальных мишеней и инженерных подходов для их создания [148]. В биспецифическом антителе могут быть объединены различные функции, например связывание мишени на поверхности опухолевых клеток и одновременная стимуляция иммунного ответа. Такая функция может достигаться за счет ингибиторов иммунных контрольных точек (антител к PD1) или активаторов Т-клеток (антител к CD3). Настоящее рассмотрение сфокусировано на биспецифических антителах, где оба паратопа связываются именно с рецептором HER2. Одно из таких антител, занидатамаб, связывается с субдоменами II и IV, объединяя свойства трастузумаба и пертузумаба в одной молекуле. За счет бивалентности и биспецифичности, занидатамаб может связываться с эпитопами как в одной молекуле HER2, так и в двух соседних рецепторах на мембране. В клеточных экспериментах данное антитело

демонстрирует более высокую по сравнению с трастузумабом и пертузумабом способность вызывать поверхностную агрегацию рецепторов с их последующей интернализацией и агрегацией [149]. Занидатамаб также стимулирует активацию системы комплемента эффективнее моноспецифичных антител. В настоящее время антитело находится в стадии клинических испытаний. Другое биспецифическое антитело, KN026, прямо объединяет тяжелые цепи трастузумаба и пертузумаба и соответственно также связывается с эпитопами на субдоменах II и IV. Информация о его активности *in vitro* опубликована не была, но можно предполагать, что биспецифичность увеличивает avidность и агрегацию рецептора, как и в случае занидатамаба. Клинические испытания первой фазы показали хорошую переносимость и эффективность терапии при помощи KN026 у пациентов с метастатическим HER2<sup>+</sup> раком молочной железы, предварительно перенесших несколько курсов лечения, а также выявили что совместная амплификация *HER2* и *CDK12* коррелирует с большей клинической пользой от лечения [150]. Биспецифические антитела к HER2 могут в скором будущем стать следующей стандартной терапией ввиду их большей специфичности, avidности, задействию сразу нескольких механизмов действия, а также меньшим побочным эффектам ввиду более низких необходимых дозировок.

#### 1.4.2 Моноклональные антитела к рецептору ErbB3

На данный момент не существует одобренных FDA для терапевтического использования таргетных препаратов, направленных против рецептора ErbB3 в опухолевых клетках. Наиболее перспективным направлением является применение моноклональных антител, что подтверждается множеством разрабатываемых в настоящее время молекул. В таблице 1 приведены наиболее исследованные антитела, находящиеся в разных фазах клинических испытаний; еще больше молекул находятся в стадии доклинических исследований. Все приведенные антитела структурно являются классическими иммуноглобулинами G, и ниже будут рассмотрены наиболее интересные и репрезентативные из них.

Антитело лумретузумаб (RG7116) было получено компанией Roche путем отбора антител необходимой специфичности из мышей, иммунизированных внеклеточным доменом ErbB3. Антитело было подвергнуто гуманизации и инженерии гликанов Fc фрагмента для обеспечения более сильного связывания с активирующим Fcγ рецептором CD16A [37]. Лумретузумаб обладает высокой аффинностью к внеклеточному домену ErbB3 ( $K_D = 0.5$  нМ) и подавляет фосфорилирование ErbB3 и Akt в HER2<sup>+</sup> линиях рака молочной железы с такой же эффективной концентрацией.

**Таблица 1** — Терапевтические моно- и биспецифические моноклональные антитела к рецептору ErbB3, находящиеся в стадии клинических испытаний. Данные основаны на обзоре [151] и приведены с сокращениями и дополнениями.

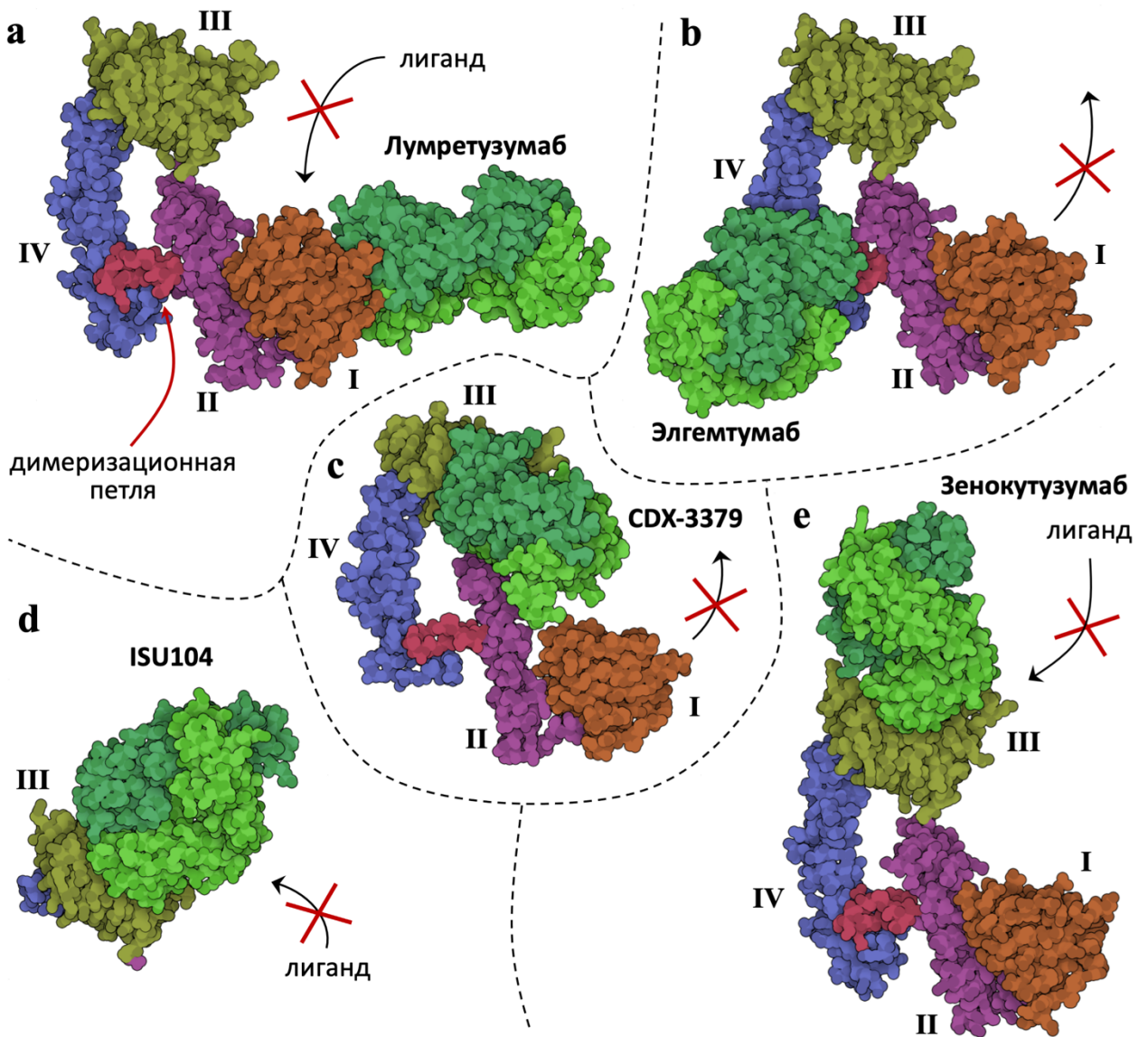
Название	Мишень	Разработчик	Фаза испытаний	Область применения
<b>Моноклональные антитела</b>				
Patritumab (U3-1287)	ErbB3	Daiichi Sankyo	Фаза III	Немелкоклеточный рак легкого, рак груди, головы и шеи
Seribantumab (MM-121)	ErbB3	Merrimack Pharmaceuticals	Фаза II	Немелкоклеточный рак легкого, рак груди, рак яичников
<b>Lumretuzumab*</b> (RG7116)	ErbB3 субдомен I	Genentech Roche	Фаза Ib/II	Немелкоклеточный рак легкого, рак груди
<b>Elgentumab*</b> (LJM716)	ErbB3 субдомены II и IV	MorphoSys Novartis	Фаза I/II	Рак груди, желудка, головы и шеи
GSK2849330	ErbB3	GlaxoSmithKline	Фаза I	Солидные опухоли
<b>CDX-3379*</b> (KTN3379)	ErbB3 субдомены II/III	Celldex Therapeutics	Фаза I	Рак головы и шеи, прогрессирующие опухоли
AV-203	ErbB3	Aveo Oncology	Фаза I	Солидные опухоли
<b>ISU104*</b>	ErbB3 субдомен III	ISU Abxis	Фаза I	Солидные опухоли
REGN1400	ErbB3	Regeneron Pharmaceuticals	Фаза I	Метастатические опухоли
<b>Биспецифические антитела</b>				
<b>Zenocutuzumab*</b> (MCLA-128)	HER2/ErbB3 субдомен III	Merus	Фаза I/II	Солидные опухоли
Duligotuzumab (MEHD7954A)	EGFR/ErbB3	Genentech Roche	Фаза II	Рак головы и шеи, прогрессирующие опухоли
Istiratumab (MM-141)	IGF1R/ErbB3	Merrimack Pharmaceuticals	Фаза II	Прогрессирующие солидные опухоли, рак поджелудочной железы, головы и шеи, колоректальный рак
SI-B001	EGFR/ErbB3	Biokin Pharma	Фаза I	Прогрессирующие или метастатические опухоли эпителия
MM-111	HER2/ErbB3	Merrimack Pharmaceuticals	Фаза I	Рак груди, HER2 <sup>+</sup> или херегулин <sup>+</sup>

\* Для данных антител получены кристаллические структуры высокого разрешения

Fab фрагмент лумретуумаба был кристаллизован в комплексе с внеклеточным доменом ErbB3, что позволило детально установить его эпитоп на субдомене I, что проиллюстрировано на рисунке 3а. Эпитоп перекрывается с сайтом связывания естественного лиганда ErbB3, херегулина, который полностью замещается при концентрациях антитела более 1 нМ. С функциональной точки зрения, лумретуумаб блокирует активацию ErbB3 и связанную с ней пролиферацию раковых клеток, стимулирует интернализацию рецептора, а также эффективно запускает антителозависимую клеточную цитотоксичность. В мышинных ксенографтах даже лумретуумаб в качестве монотерапии ведет к регрессии HER2<sup>+</sup> опухолей, и его действие усиливается совместно с пертузумабом.

Антитело элгемтумаб (LJM716) было отобрано из синтетической комбинаторной библиотеки человеческих антител NuCAL в компании Novartis [36]. Функциональный отбор кандидатов был основан на одновременном блокировании фосфорилирования и пролиферации на клеточной линии SK-BR-3, где активация обеспечивается гиперэкспрессией HER2, и линии MCF-7, где пролиферация стимулируется херегулином. Таким образом было найдено уникальное антитело, обладающее способностью блокировать как стимулированную лигандом, так и лиганд-независимую пролиферацию, и имеющее высочайшую аффинность к ErbB3,  $K_D = 0.03$  нМ. Fab фрагмент элгемтумаба был кристаллизован с комплексе с внеклеточным доменом ErbB3. Полученная структура продемонстрировала необычный механизм связывания с субдоменами II и IV, при котором антитело закрывает сверху димеризационную петлю, блокируя ее диссоциацию с субдоменом IV и не давая ErbB3 выйти из аутоингибированного состояния (показано на рисунке 3b). Таким образом элгемтумаб не конкурирует напрямую с лигандом, но эффективно подавляет активацию ErbB3 и пролиферацию опухолевых клеток. В экспериментах *in vivo* на животных моделях опухолей элгемтумаб показывает превосходную эффективность в комбинации с антителами к EGFR и HER2, цетуксимабом и трастузумабом [36].

Полностью человеческое антитело CDX-3379, разработанное в Йельском университете, связывается с ErbB3 с равновесной константой диссоциации  $K_D = 0.2$  нМ, при этом связывание обусловлено преимущественно взаимодействием с субдоменом III [38]. Данное антитело также блокирует как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую пролиферацию клеток рака молочной железы. Структурные данные демонстрируют необычный аллостерический механизм, при котором антитело связывается с субдоменом III вблизи субдомена II (проиллюстрировано на рисунке 3с) и делает стерически невозможным конформационный переход из аутоингибированного состояния, при котором субдомен II должен повернуться относительно III.



**Рисунок 3** — Структуры Fab фрагментов антител к ErbB3 в комплексе с внеклеточным доменом рецептора. Темно-зеленым цветом показаны тяжёлые цепи антител, светло-зеленым — лёгкие, цветовая маркировка субдоменов ErbB3 одинаковая на всех панелях. **(а)** Антитело лумретузумаб связывается с субдоменом I и блокирует присоединение лиганда, структура PDB: 4LEO. **(б)** Элгемтумаб связывается с субдоменами II и IV и блокирует диссоциацию димеризационной петли, необходимую для конформационной перестройки, PDB: 4P59. **(в)** CDX-3379 связывается с субдоменом III и блокирует поворот субдомена II при активации, PDB: 5CUS. **(д)** ISU104 связывается с субдоменом III и блокирует присоединение лиганда, кристаллизован комплекс антитела с изолированным субдоменом, PDB: 7D85. **(е)** Эпитоп зенкутузумаба на субдомене III близок эпитопу ISU104, антитело также блокирует присоединение лиганда, PDB: 5O7P.



Другое недавно разработанное полностью человеческое антитело, ISU104, было отобрано из синтетической комбинаторной библиотеки и показало чрезвычайно высокую аффинность к рецептору с равновесной константой диссоциации  $K_D < 0.075$  нМ [152]. Биофизические и структурные данные показывают, что ISU104 связывается эпитопом на субдомене III (рисунок 3d), который отличается от CDX-3379, и перекрывается с сайтом связывания херегулина. Таким образом антитело блокирует связывание лиганда, а также усиливает интернализацию рецептора, снижает гетеродимеризацию с HER2 и фосфорилирование ErbB3. В мышинных ксенографтах ISU104 проявляет различную активность в зависимости от используемой раковой клеточной линии, наибольший эффект торможения роста опухоли наблюдается для модели немелкоклеточного рака легкого.

Как видно из рисунка 3, все разрабатываемые антитела к рецептору ErbB3, для которых есть детальная структурная информация о связывании с рецептором, взаимодействуют с аутоингибированной конформацией. Вероятно, это связано с тем, что данная конформация является стабильной формой изолированного внеклеточного домена ErbB без лиганда, и соответственно именно она определяет репертуар антител при иммунизации и фаговом отборе. Аналогичных пертузумабу антител, взаимодействующих с димеризационной петлей в активированном состоянии, для ErbB3 пока не разработано. Можно предположить, что в дальнейшем будут найдены новые антитела к эпитопам на субдомене II, непосредственно блокирующие гетеродимеризацию ErbB3.

### **Биспецифические антитела к рецептору ErbB3 и EGFR/HER2**

Наряду с классическими моноклональными антителами также ведется разработка биспецифических молекул, связывающихся с ErbB3 и EGFR/HER2. В отличие от рассмотренных выше бипаратопных антител к HER2, данные молекулы являются по-настоящему биспецифическими, т. к. воздействуют на две различных мишени. Несмотря на функциональную значимость ErbB3, тирозинкиназная активность в гетеродимерах обеспечивается рецепторами EGFR/HER2, и именно они часто амплифицированы в опухолях и являются первоочередной мишенью. В тех из приведенных работ, где эффективность антител к ErbB3 *in vivo* оценивалась в том числе в комбинации с анти-HER2 антителом, совместное применение двух антител всегда обеспечивало более быстрый регресс опухоли [36; 37]. Перечень биспецифических антител в стадии клинических испытаний приведен в таблице 1, ниже более подробно рассмотрены две молекулы для одновременного блокирования HER2 и ErbB3.

Зенкутузумаб (MCLA-128) является биспецифическим HER2/ErbB3 антителом, переменные фрагменты которого были отобраны из иммунизированных мышей и затем гуманизированы [153]. Функциональный отбор производился по ингибированию пролиферации опухолевых клеток при стимуляции херегулином. В результате исследования различных

комбинаций HER2 и ErbB3 фрагментов было установлено, что наивысшую активность имеют биспецифические антитела, в которых антитело к HER2 связывается с субдоменом I. Зенокутузумаб связывается с субдоменом I рецептора HER2 и субдоменом III рецептора ErbB3 с наблюдаемой равновесной константой диссоциации  $K_D = 2$  нМ. Эпитоп зенокутузумаба на ErbB3 пересекается с эпитопом антитела ISU104 и сайтом связывания херегулина, также связывание антитела стерически блокирует конформационную перестройку рецептора (рисунок 3е). Предполагается, что связывание одного переменного фрагмента зенокутузумаба с HER2 оптимально позиционирует второй переменный фрагмент для взаимодействия с ErbB3, что ведет к подавлению димеризации и фосфорилирования. В экспериментах *in vivo* антитело сдерживает рост опухолей и демонстрирует немного большую эффективность, чем комбинация трастузумаба и пертузумаба [153]. В недавнем небольшом клиническом исследовании зенокутузумаб был применен для лечения трех пациентов со слиянием гена NRG1 и показал эффективность для пациента, ранее прогрессирующего на шести различных видах терапии [154]. Данный результат демонстрирует возможность применения данного антитела для лечения опухолей, рост которых стимулируется лигандом ErbB3.

Необычной биспецифической антителоподобной молекулой является MM-111, которую разрабатывают в компании Merrimack Pharmaceuticals. MM-111 состоит из двух полностью человеческих одноцепочечных переменных фрагментов антител к рецепторам HER2 и ErbB3, которые соединены с одной молекулой модифицированного человеческого сывороточного альбумина [155]. Таким образом у MM-111 отсутствует Fc фрагмент, что не позволяет ей задействовать связанные с ним эффекторные функции, активацию системы комплемента и антителозависимую клеточную цитотоксичность. При этом связывание альбумина с рецептором FcRn может обеспечить длительную системную циркуляцию молекулы, аналогично классическим антителам. Молекула MM-111 имеет высокую avidность ( $K_D = 0.3$  нМ) и блокирует связывание лиганда с ErbB3, что ведет к подавлению его активации и фосфорилирования. В экспериментах с мышинными ксенографтами *in vivo* MM-111 замедляет рост опухоли, и это действие усиливается при комбинации с ингибитором тирозинкиназной активности или трастузумабом [155]. Несмотря на эффективное блокирование связывания лиганда и активации ErbB3, препарат MM-111 пока не продемонстрировал преимуществ перед стандартными методами лечения в клинических испытаниях. Вероятно, одной из причин является пренебрежение эффекторными функциями Fc фрагмента, которые во многом определяют клиническую эффективность иммунопрепаратов.

### 1.4.3 Иммуноконъюгаты с цитотоксическими лекарствами

Конъюгаты антител с цитотоксическими лекарствами наиболее точно реализуют концепцию «магической пули» Пауля Эрлиха. Антитела к опухолевым антигенам позволяют доставить высокоактивный цитотоксический препарат непосредственно в раковые клетки, тем самым снижая системную токсичность. Клиническая эффективность нескольких одобренных FDA иммуноконъюгатов оказалась чрезвычайно высокой, и более ста различных молекул такого типа находятся в стадии клинических испытаний [156]. Иммуноконъюгаты состоят из трех компонентов: антитела к специфическому поверхностному антигену опухолевых клеток, химического линкера, обеспечивающего стабильную конъюгацию с низкомолекулярным лекарством, и собственно высокоактивного цитотоксического препарата.

Иммуноконъюгаты первого поколения обладали рядом недостатков, в частности недостаточно стабильными линкерами, гетерогенностью сайтов конъюгации и количества молекул лекарства на одно антитело, и недостаточной активностью токсинов. Новые подходы в химии биоконъюгации позволили проводить направленную модификацию определенных сайтов белка для создания препаратов с заданной стехиометрией, обычно 2–4 молекулы токсина на каждое антитело [157]. Более совершенные линкеры, соединяющие антитело с лекарством, обладают высокой стабильностью при циркуляции в кровотоке и тем самым снижают токсичность препарата. Линкеры могут быть как полностью стабильными, так и расщепляемыми при определенных условиях, и в современных иммуноконъюгатах реализуются обе концепции [157]. Расщепляемые линкеры позволяют высвободить цитотоксический препарат после интернализации антитела внутри лизосом раковой клетки в ответ на снижение pH или вследствие действия определенных протеаз. Свободные молекулы цитотоксического препарата после расщепления линкеров могут не только действовать непосредственно на клетку-мишень, но и диффундировать в соседние клетки и реализовывать так называемый «эффект прохожего» [158]. Локальная диффузия препарата в опухоли позволяет воздействовать даже на клетки, не имеющие поверхностного антигена, и таким образом преодолевать один из механизмов резистентности, гетерогенность опухолевых клеток [21].

Количество доставляемого в клетку цитотоксического препарата ограничено числом поверхностных рецепторов и степенью конъюгации антител, что требует использования высокоактивных токсинов с  $IC_{50}$  в диапазоне  $10^{-12}$ – $10^{-10}$  М. Стандартные цитотоксические препараты, например метотрексат и антрациклины (доксорубин, дактиномицин, блеомицин), оказываются недостаточно активными для этой цели [157]. В основном используются молекулы, напрямую воздействующие на ДНК и убивающие как делящиеся, так и не делящиеся клетки, либо действующие на микротрубочки и соответственно токсичные преимущественно для

делящихся клеток. Двумя наиболее распространенными типами токсинов в разрабатываемых иммуноконъюгатах являются ауристатины и маитанзины [157]. Оба класса препаратов эффективно блокируют полимеризацию тубулина в микротрубочки, обладают благоприятными физико-химическими свойствами, и имеют прекрасно разработанные технологии присоединения линкеров для биоконъюгации.

Применение иммуноконъюгатов с лекарствами является относительно новым подходом в терапии солидных опухолей, и в настоящее время существует всего два таких препарата, одобренных для лечения рака молочной железы. Первым из них стал трастузумаб эмтанзин, одобренный для терапевтического применения в 2013 году. Данный препарат содержит токсин DM1 из класса маитанзинов, конъюгированный с лизинами в трастузумабе при помощи нерасщепляемого тиоэфирного линкера [159]. Трастузумаб эмтанзин показал высокую клиническую эффективность у пациентов с остаточным инвазивным HER2<sup>+</sup> раком молочной железы после стандартного химиотерапевтического лечения с трастузумабом в качестве неoadъюванта. Использование цитотоксического иммуноконъюгата вместо обычного трастузумаба в этой группе снизило риск прогрессии заболевания и смерти в два раза [160].

Вторым препаратом данного класса является трастузумаб дерукстекан, одобренный в 2019 году. При создании этой молекулы был сделан целый ряд инноваций: разработан новый эффективный токсин, получены высокие степени конъюгации и найден линкер, одновременно имеющий высокую стабильность в кровотоке и быстро расщепляющийся в раковой клетке [161]. В данном препарате трастузумаб конъюгирован с оптимизированным ингибитором топоизомеразы I, созданным на основе иринотекана. Дерукстекан является действующим метаболитом иринотекана и соответственно более активен, но при этом нестабилен *in vivo* в неконъюгированной форме, в результате чего снижено его побочное действие. Благодаря растворимости линкера удалось достичь высокой степени конъюгации (8:1) без ухудшения физико-химических свойств антитела. В качестве линкера использован тетрапептид GGFG, который обладает достаточной стабильностью в кровотоке, и при этом быстро и селективно гидролизует внутри раковых клеток катепсинами, экспрессия которых повышена в опухолях. Молекула дерукстекана свободно диффундирует через клеточные мембраны, в результате чего после расщепления линкера начинает реализовываться «эффект прохожего» на соседние опухолевые клетки. В клинических исследованиях трастузумаб дерукстекан показал неожиданно высокую эффективность у пациентов с метастатическим HER2<sup>+</sup> раком молочной железы, ранее прошедших многократные (медиана 6) курсы лечения [162]. Еще более многообещающими представляются результаты недавнего исследования, в котором лечение трастузумабом дерукстеканом привело к двукратному снижению риска у пациентов с метастатическим HER2<sup>low</sup> раком молочной железы [163]. Данная группа характеризуется детектируемым, но низким

уровнем экспрессии HER2, и эффективного лечения для таких пациентов до сих пор не существовало.

Находящиеся в стадии испытаний иммуноконъюгаты против рецептора HER2 рассмотрены в недавнем обзоре [21]. Однако для доставки цитотоксических лекарств могут использоваться антитела не только к HER2, но и к ErbB3. Рецептор ErbB3 является не такой очевидной самостоятельной мишенью, но уже получены свидетельства эффективности терапии анти-ErbB3 цитотоксическими иммуноконъюгатами в случае опухолей с повышенной экспрессией данного рецептора. В частности, патритумаб (таблица 1) разрабатывается не только как стандартное терапевтическое антитело к ErbB3, но и в формате конъюгата с дерукстефаном [164]. Данный препарат в настоящее время находится во второй фазе клинических испытаний для опухолей различной локализации: рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, колоректального рака. Иммуноконъюгат на основе другого антитела к ErbB3, EV20, показывает активность в модели меланомы в доклинических исследованиях [165]. Удивительно, но на данный момент не предложены иммуноконъюгаты на основе биспецифических HER2/ErbB3 или EGFR/ErbB3 антител, которые могли бы быть эффективными вследствие их повышенной avidности и эффективной интернализации. Можно ожидать что некоторые из находящихся в разработке в настоящее время биспецифических молекул могут быть впоследствии переформатированы в цитотоксические иммуноконъюгаты.

#### **1.4.4 Альтернативные подходы для блокирования ErbB3**

Помимо классических антител и созданных на их основе биспецифических химер, разрабатываются несколько альтернативных подходов для терапии ErbB3-зависимых опухолей. ErbB3-вакцины и малые интерферирующие РНК для подавления его экспрессии остаются за пределами области настоящего исследования, и ниже будут рассмотрены интересные классы молекул, непосредственно взаимодействующих с рецептором.

Классическим подходом к блокированию сигнализации рецепторами ErbB является использование низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназ, свободно проникающих через клеточную мембрану и связывающихся с внутриклеточным каталитическим доменом. Отсутствие тирозинкиназной активности ErbB3 сужает возможности фармакологического блокирования до воздействия исключительно на внеклеточный домен. Несмотря на кажущуюся бесперспективность применения низкомолекулярных лекарств, в оригинальном исследовании был создан ингибитор ErbB3 с антипролиферативной активностью в микромолярном диапазоне [166]. Найденная молекула селективно образует ковалентную связь с цистеином вблизи каталитического сайта ErbB3 и блокирует связывание молекулы АТФ, но ожидаемо не

влияет на фосфорилирование. Однако при модификации найденного ингибитора адамантаном наблюдается антипролиферативное действие на раковые клетки, которое связано со стимуляцией деградации рецептора и блокированием гетеродимеризации с HER2. Таким образом показана принципиальная возможность использования низкомолекулярных ингибиторов для воздействия на HER2/ErbB3 сигнализацию.

Для блокирования внеклеточного домена ErbB3 были использованы интересные неканонические антитела, называемые «сурротела». Комбинаторные библиотеки сурротел на основе пре-B-клеточных рецепторов впервые созданы в лаборатории Ричарда Лернера для расширения репертуара иммунных молекул, доступного для фармакологической разработки [167]. Пре-B-клеточный рецептор структурно отличается от антитела тем, что каждая тяжелая цепь спарена не с единственной легкой цепью, а с двумя компонентами суррогатной легкой цепи. Созданные на основе пре-B-клеточных рецепторов сурротела представляют собой гомодимеры двух тримеров из стандартных тяжелых цепей и двух коротких легких цепей, и имеют еще большее комбинаторное разнообразие, чем классические иммуноглобулины G. Два сурротела против рецептора ErbB3 были отобраны из человеческой комбинаторной библиотеки и продемонстрировали высокую антипролиферативную активность на ряде раковых клеточных линий [168]. При этом сурротела блокировали как стимулированную лигандом, так и лиганд-независимую пролиферацию. В экспериментах *in vivo* отобранные молекулы продемонстрировали высокую эффективность в комбинации с трастузумабом и ингибиторами тирозинкиназ. Функциональные характеристики сурротел в доклинических исследованиях оказались сравнимы с рассмотренными выше классическими антителами к ErbB3, но их дальнейшая разработка пока приостановлена. Вероятно, это обусловлено отсутствием очевидных преимуществ перед классическими антителами при более сложной структуре и невозможности применения некоторых стандартных технологий.

Другим еще более экзотическим классом молекул, разработанных для связывания с внеклеточным доменом ErbB3, являются аффитела. Аффитела представляют собой небольшие белки (около 6 кДа) со структурой из трех  $\alpha$ -спиралей, заимствованной у белка А стафилококка. Их стабильный фолд выступает отличным каркасом для инженерии сайта связывания. Отбор аффител со специфическим связыванием с мишенью осуществляется путем фагового дисплея квазислучайных комбинаторных библиотек, в которых варьируются аминокислотные остатки паратопа, образованного двумя  $\alpha$ -спиралями [169]. Технология аффител, разрабатываемая шведской компанией Affibody, замещает природную иммунизацию и позволяет получать *in vitro* полностью синтетические молекулы с высокоаффинным взаимодействием с мишенью. Несколько отобранных таким путем аффител к рецептору ErbB3 имеют аффинность около 1 нМ [170]. В клеточных экспериментах два наиболее перспективных аффитела блокируют

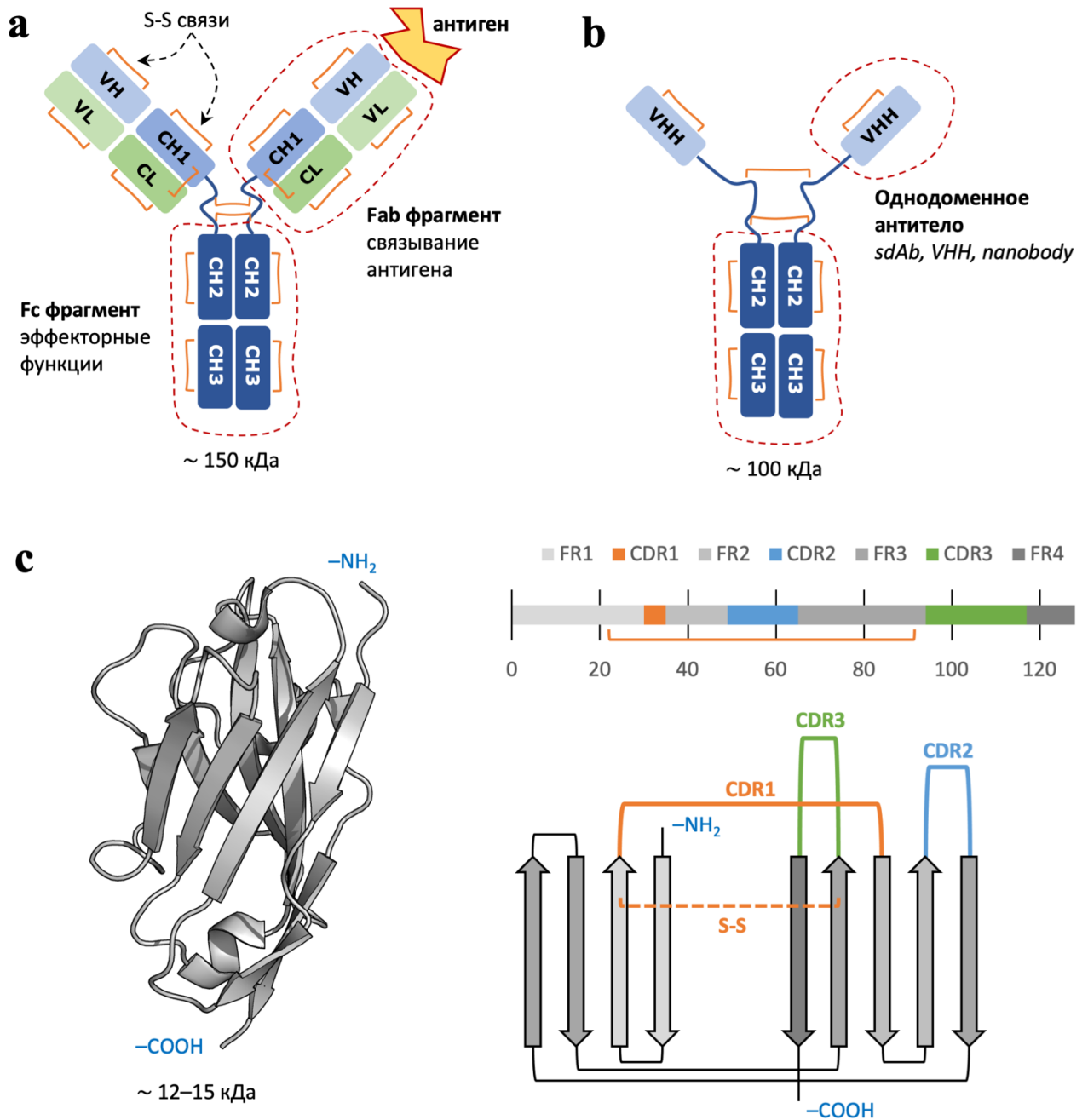
связывание херегулина с рецептором, подавляют стимулированные лигандом фосфорилирование ErbB3 и Akt и пролиферацию клеток рака молочной железы [171]. Можно предположить, что данные аффитела связываются с субдоменом I рецептора в области сайта присоединения лиганда, аналогично лумретузамабу. Аффитела не могут задействовать эффекторные функции иммунитета без дополнительного инжиниринга в полноразмерную антителоподобную молекулу с Fc фрагментом. Их потенциальной областью применения является доставка радиоактивной или цитотоксической метки в опухоль для терапии и диагностики, как это реализуется компанией Affibody для рецептора HER2.

## 1.5 Однодоменные антитела верблюдовых как альтернатива классическим IgG

### 1.5.1 Структура и свойства однодоменных антител

Природные антитела, не имеющие легких цепей, были открыты в 1993 году в сыворотке верблюда (*Camelus dromedarius*) [39]. Оказалось, что представители семейства верблюдовых, например ламы (*Lama glama*) и верблюды, обладают уникальным среди всех млекопитающих репертуаром иммуноглобулинов G. Помимо обычных антител в их сыворотке также есть два субтипа неканонических IgG без CH1 домена тяжелой цепи и соответственно без легких цепей. В первом субтипе тяжелоцепочечных антител вместо CH1 домена находится удлиненный шарнирный участок наподобие имеющегося в человеческих антителах субтипа IgG3. Во втором субтипе вариабельный домен тяжелой цепи соединяется с CH2 доменом стандартным коротким линкером, как в человеческих антителах субтипов IgG2 и IgG4. Таким образом полноразмерные антитела этих двух необычных субтипов представляют собой гомодимеры двух тяжелых цепей молекулярной массой около 100 кДа. В сыворотке верблюда сосуществуют классические и тяжелоцепочечные антитела, при этом доля вторых составляет примерно три четверти от всех IgG. Большая доля тяжелоцепочечных антител говорит о том, что данные молекулы являются не случайной абберацией, но функционально значимым результатом адаптации иммунной системы верблюдовых. В эксперименте с инфицированными животными было показано, что титр и сложность репертуара распознаваемых бактериальных антигенов для тяжелоцепочечных антител даже больше чем для классических IgG [39].

Схематичное изображение структур классических иммуноглобулинов G и неканонических тяжелоцепочечных антител верблюдовых приведено на рисунке 4. Классические IgG (рисунок 4а) состоят из двух тяжелых и двух легких цепей. Тяжелые цепи имеют четыре иммуноглобулиновых домена, VH, CH1, CH2 и CH3, первый из которых является вариабельным, а три остальных константными. Легкие цепи состоят из одного вариабельного домена (VL) и одного константного домена (CL).



**Рисунок 4** — Структура классических иммуноглобулинов G и неканонических антител верблюдовых. **(a)** Классические IgG состоят из двух тяжелых цепей (домены VH, CH1, CH2, CH3) и двух легких цепей (домены VL и CL). **(b)** Неканонические антитела верблюдовых не имеют легких цепей и CH1 доменов тяжелой цепи. Связывание с антигеном определяется единственным переменным доменом. **(c)** Изолированный переменный домен (однодоменное антитело) обладает иммуноглобулиновым фолдом, относящимся к структурному классу  $\beta$ -сэндвичей. Схематично изображена пространственная структура однодоменного антитела (PDB: 6EZW) и его топология. Гиперварибельные участки CDR1–3 отмечены цветами, каркасные области FR1–4 отображены различными оттенками серого.



Каждый вариабельный домен содержит относительно консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельных участка, называемых CDR, определяющих связывание с антигеном. Именно гипервариабельные участки формируют петли длиной 5–25 аминокислотных остатков и обладают огромным комбинаторным разнообразием последовательностей, которое обеспечивает распознавание практически любых молекулярных эпитопов.

Неканонические антитела верблюдовых (рисунок 4b) не имеют CH1 доменов тяжелой цепи, что влечет за собой три важных последствия. Во-первых, основной контакт между тяжелой и легкой цепью в молекуле IgG формируется за счет константных доменов CH1 и CL и стабилизирован гидрофобными взаимодействиями на их интерфейсе и межмолекулярной дисульфидной связью. Изолированный CH1 является единственным внутренне-неупорядоченным белком из всех доменов в молекуле IgG и фолдируется только при формировании комплекса с CL [172]. Следовательно, отсутствие CH1 домена делает невозможной стабильную ассоциацию легкой цепи. Во-вторых, в процессе биосинтеза антитела частично фолдированный CH1 формирует комплекс с шапероном BiP в эндоплазматическом ретикулуме и для дальнейшего транспорта белка в аппарат Гольджи необходимо замещение BiP доменом CL легкой цепи. Из-за этого механизма контроля стандартные антитела не могут покинуть эндоплазматический ретикулум без легких цепей. Отсутствие CH1 домена в неканонических антителах позволяет им преодолеть эту контрольную точку. В-третьих, стандартные антитела агрегируют в отсутствие легких цепей из-за неупорядоченных CH1 доменов и экспонированных гидрофобных участков. Тяжелоцепочечные антитела верблюдовых без CH1 доменов обладают прекрасной растворимостью и агрегационной стабильностью.

Вариабельный фрагмент неканонического антитела верблюдовых (рисунок 4c) представляет собой одиночный иммуноглобулиновый домен массой 12–15 кДа, который в четыре раза меньше Fab фрагмента стандартного антитела. Данный фрагмент имеет несколько названий: однодоменное антитело (sdAb), VHH или «нанотело». Последовательность однодоменного антитела содержит четыре каркасных области FR1–4 и три гипервариабельных участка CDR1–3. Структурно иммуноглобулиновый домен представляет собой  $\beta$ -сэндвич, состоящий из двух антипараллельных  $\beta$ -листов. Топология однодоменного антитела представлена на рисунке 4c. Каркасные области FR1–4 соответствуют  $\beta$ -листам и формируют общую структуру антитела. Гипервариабельные участки формируют три петли со стороны N-конца белка, которые образуют паратоп связывания с антигеном. Однодоменные антитела содержат по крайней мере одну консервативную дисульфидную связь, имеющуюся у всех доменов IgG, между цистеинами 22 и 92 в стандартной нумерации по Кабат.

Однодоменные антитела обладают уникальными биохимическими характеристиками по сравнению со стандартными Fab фрагментами. Основные отличия однодоменных антител от

обычных VH доменов сосредоточены в каркасной области FR2, взаимодействующей с VL доменом в обычном Fab фрагменте. Четыре консервативных гидрофобных аминокислотных остатка в позициях 37, 44, 45 и 47 (нумерация по Кабат) в VH домене, формирующие контакт с VL, заменены в однодоменных антителах на гидрофильные аминокислоты [40]. Более высокая гидрофильность повышает растворимость антител, а также вероятно косвенно положительно влияет на их термодинамическую стабильность. В среднем термическая денатурация однодоменных антител ламы происходит при  $T_M = 70.2$  °C [173], что делает их гораздо более конформационно стабильными чем Fab фрагменты классических антител [174]. Однодоменная структура также обеспечивает быстрый и эффективный фолдинг, и практически все однодоменные антитела могут быть рефолдированы *in vitro*. Главным фактором, определяющим обратимость денатурации и возможность рефолдинга, по-видимому является высокая агрегационная стабильность. В недавнем исследовании 68 однодоменных антител лам и верблюдов было показано, что 60% из них не агрегируют даже при нагревании до 95 °C [175].

Антитела различных видов позвоночных обладают уникальными структурными характеристиками, наиболее необычными из которых помимо тяжелоцепочечных антител верблюдовых являются цистеин-богатые IgY у куриц и IgG с аномально длинными CDR H3 у коров [42]. Генетические и структурные особенности антител выражаются в особом антигенном репертуаре и нестандартных механизмах молекулярного распознавания. Так, у верблюдовых существует два отдельных набора V-генов для классических VH (~50 вариантов) и однодоменных VHH (~40 вариантов), что обеспечивает гораздо более высокое разнообразие тяжелых цепей по сравнению с человеком (65 V-генов). Неканонические антитела отличаются более вариативным CDR1, в котором несколько предшествующих стандартному CDR H1 аминокислотных остатков (позиции 27–30) подвергаются соматической гипермутации [41]. VHH фрагменты на порядок чаще, чем обычные VH, содержат делеции и инсерции в области паратопа, что обеспечивает его большую вариативность, а также часто имеют дополнительные цистеины, стабилизирующие взаимное расположение петель CDR1 и CDR3 [41]. Глубокое секвенирование антител верблюдов показывает, что средняя длина CDR3 в неканонических антителах составляет 18 остатков, гораздо больше чем в стандартных IgG, где она всего 13 аминокислот [176]. В однодоменных антителах также выше частота мутаций, причем не только в гипервариабельных, но и в каркасных участках. Большая вариативность паратопа и прилегающих областей, длинный CDR3 и небольшой каркас, на котором расположен сайт связывания, позволяют однодоменным антителам распознавать эпитопы, недоступные для обычных IgG. В частности, однодоменные антитела часто связываются с глубокими карманами на поверхности белков, например с активными сайтами ферментов. Детальное структурное исследование комплексов обычных и однодоменных антител с лизоцимом демонстрирует, что практически все однодоменные

антитела связывают вогнутые эпитопы за счет длинных CDR3, которые проникают в активный центр [177]. Обычные Fab фрагменты, наоборот, взаимодействуют с выпуклыми эпитопами из-за своей димерной структуры с вогнутой поверхностью на интерфейсе тяжелых и легких цепей. При этом общая площадь контакта с антигеном и, соответственно, аффинность не отличаются существенно у обычных и однодоменных антител, и лучшее нанотело имеет  $K_D$  всего 77 пМ [177].

### **1.5.2 Использование технологий ДНК библиотек и фагового дисплея для отбора однодоменных антител**

Источником неканонических антител могут быть иммунизированные ламы и верблюды, трансгенные животные, а также синтетические ДНК библиотеки. Использование животных является предпочтительным методом, поскольку отобранные антитела как правило обладают более аффинным связыванием и лучшими физико-химическими характеристиками. Созревание, то есть улучшение свойств антител, происходит в результате соматической гипермутации генов В-клеточных рецепторов. Для стимуляции процесса созревания антител и повышения их титра проводятся повторные раунды иммунизации одним и тем же антигеном. Классический протокол получения однодоменных антител начинается с иммунизации лам, которая проводится путем шести еженедельных подкожных инъекций высококачественным белком-антигеном [178]. Поскольку однодоменные антитела преимущественно распознают стерические эпитопы, антиген должен иметь стабильную конформацию, которая соответствует его структуре в организме. После отбора крови иммунизированных животных, кодирующие однодоменные антитела фрагменты могут быть амплифицированы из кДНК В-лимфоцитов при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этого используются универсальные праймеры к определенному участку СH2, который одинаков у всех изотипов тяжелых цепей верблюдовых, и консервативной лидерной последовательности V-фрагментов.

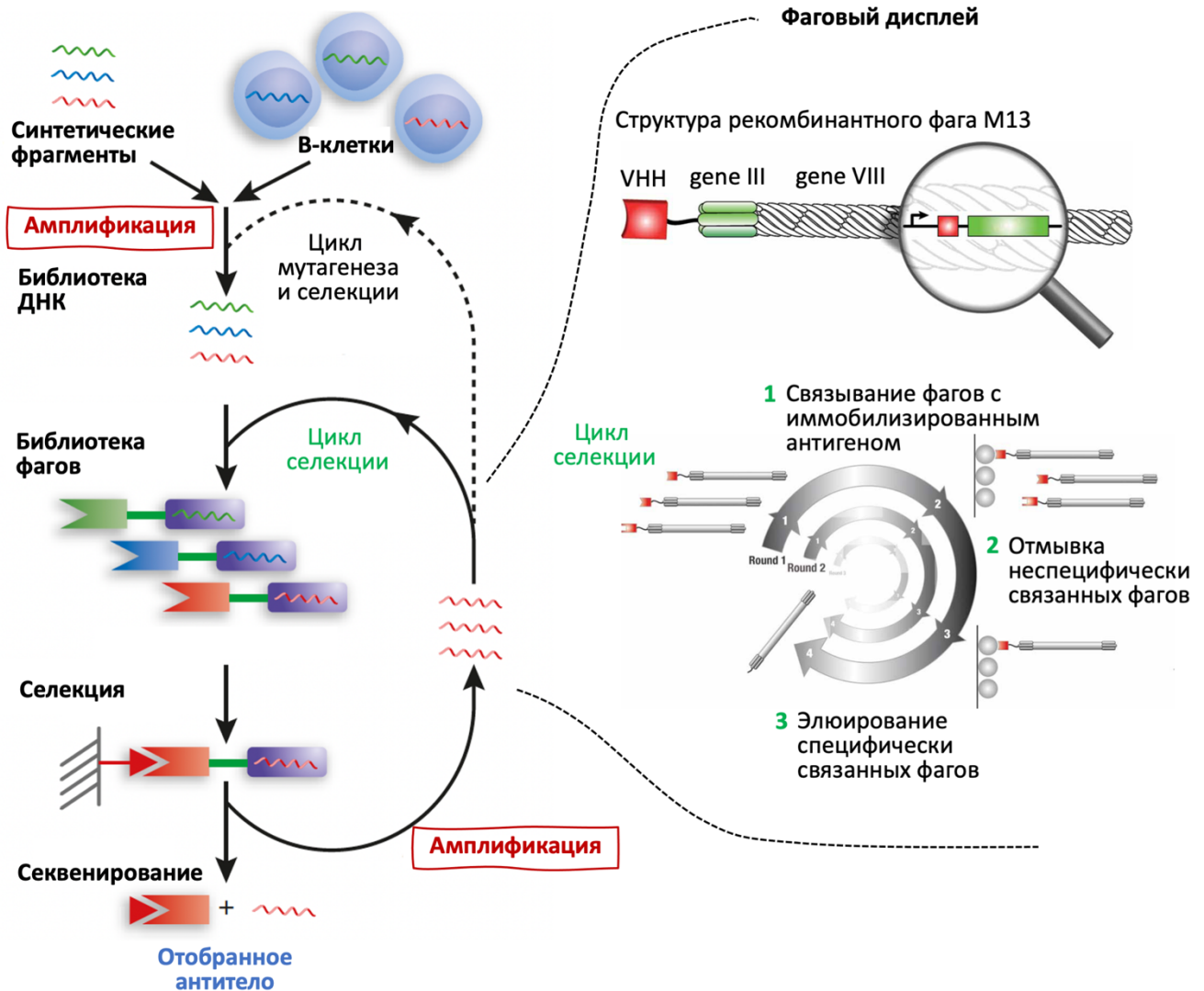
Для преодоления сложностей, сопутствующих работе с такими крупными животными как ламы и верблюды, ведутся активные исследования трансгенных мышей и крыс как эффективной платформы для получения однодоменных антител [179]. В основополагающем исследовании [180] были созданы трансгенные мыши, которым в локус генов антител были добавлены два V-сегмента лам, все D и J сегменты антител человека и затем константные сегменты человеческих генов IgG2/IgG3 без кодирующего СH1 участка. Данные трансгенные мыши после иммунизации антигеном успешно вырабатывали неканонические антитела без легких цепей, являющиеся гибридами V<sub>H</sub> фрагментов ламы и V<sub>H</sub> фрагментов человека. В настоящее время большинство исследований трансгенных животных сосредоточены на создании

полностью человеческих однодоменных антител для того, чтобы снизить вероятность потенциальной иммунной реакции. В частности, авторы оригинального исследования [180] впоследствии создали других трансгенных мышей, заменив изначально использованные V-сегменты генов лам на человеческие. Оказалось, что таким образом можно получать полностью человеческие неканонические тяжелоцепочечные антитела, не имеющие характерных для верблюдовых замен в области FR2, но тем не менее обладающие благоприятными биофизическими свойствами [181]. Таким образом было доказано, что в трансгенных животных можно сразу получать полностью человеческие однодоменные антитела, минуя гуманизацию антител верблюдовых.

Альтернативным подходом является использование полностью синтетических комбинаторных библиотек однодоменных антител. Для создания первой такой библиотеки, NaLi-H1, был проведен анализ однодоменных антител ламы и построена консенсусная последовательность каркасной области, соответствующая максимальной стабильности. Этот оптимизированный каркас антитела затем был частично гуманизирован, но специфичные для лам гидрофильные остатки в области FR2 сохранены. Общая архитектура трех участков CDR создана рационально, после чего разнообразие их последовательностей достигнуто за счет комбинаторной сборки синтетических тринуклеотидных фрагментов, что дало  $3 \cdot 10^9$  уникальных последовательностей [182]. Несмотря на отсутствие этапа созревания антител, из библиотеки NaLi-H1 отбираются стабильные антитела с суб-наномолярными аффинностями к ряду антигенов. Данный подход позволяет исключить эксперименты с животными и при необходимости рационально конструировать каркасные и гипервариабельные области, тем самым управляя свойствами и репертуаром антител.

Независимо от источника антител, будь то иммунизированные или неиммунизированные животные, пациенты с определенным заболеванием или полностью синтетические наборы последовательностей, их дальнейший отбор и оптимизация основаны на применении технологий ДНК библиотек. После синтеза или клонирования кодирующих последовательностей антител необходимо выявить те из них, которые связывают антиген с высокой аффинностью. Общая схема технологий отбора антител представлена на рисунке 5. Различные платформы для селекции антител из высокорепрезентативных библиотек подробно рассмотрены в классическом обзоре [183]. Все они включают так называемые дисплейные технологии, позволяющие экспонировать множество рекомбинантных антител для связывания с антигеном. Суть дисплея заключается в том, что рекомбинантное антитело обогащается одновременно с кодирующей его последовательностью ДНК. Следовательно, появляется возможность провести несколько циклов биохимической селекции антител, основанных на силе связывания с антигеном, и затем определить последовательности наилучших кандидатов методами ДНК секвенирования. Первой

такой технологией стал фаговый дисплей, за изобретение и применение которого к отбору моноклональных антител Джордж Смит и Грегори Винтер были удостоены Нобелевской премии по химии 2018 года. В фаговом дисплее кодирующие переменные фрагменты антител последовательности ДНК встраиваются в один из генов капсида фага, как показано на рисунке 5 на примере филаментного фага M13. Полученные рекомбинантные вирионы несут на своей поверхности различные переменные фрагменты, что позволяет эффективно проводить их селекцию [184].



**Рисунок 5** — Технологии ДНК библиотек и фагового дисплея для отбора антител. Разнообразие антител кодируется библиотеками ДНК, на основе которых затем создаются библиотеки фагов, несущих на своей поверхности переменные фрагменты антител. В результате циклов селекции фагов по силе связывания с антигеном удается отобрать те из них, которые несут наиболее аффинные антитела на своем капсиде. Секвенирование геномов отобранных фагов позволяет установить последовательности антител. Технология включает этапы амплификации библиотеки (на схеме отмечены красным), на которых необходимо сохранить ее репертуар. Иллюстрация цитируется с изменениями по [183; 184].

При этом однодоменные антитела как нельзя лучше подходят для фагового дисплея, поскольку отсутствие легких цепей снимает проблемы их корректного спаривания, а сами белки характеризуются эффективным фолдингом и могут быть получены в бактериях. Помимо отбора кандидатов из библиотек, данная технология также может использоваться для оптимизации аффинности антител путем генерации и последующего скрининга библиотек мутантов [183]. Таким образом фаговый дисплей является основной технологией отбора и оптимизации однодоменных антител.

Технологии отбора антител включают несколько этапов амплификации библиотек ДНК при помощи ПЦР на этапе клонирования исходных последовательностей, создания рекомбинантных фагов и секвенирования. Амплификация неминуемо ведет к искажению репертуара библиотек и уменьшению их клонального разнообразия. Это происходит из-за варьирующихся скоростей амплификации различных клонов и формирования побочных продуктов из-за случайной гибридизации гомологичных участков. Одним из способов преодоления проблемы неравномерной амплификации сложных библиотек ДНК может быть использование технологий капельной микрофлюидики. В эмульсионной ПЦР одиночные молекулы ДНК инкапсулированы в индивидуальные капли эмульсии воды в масле, что позволяет проводить реакции амплификации независимо друг от друга [185]. Было показано, что использование такой технологии в иммунологии позволяет отбирать редкие антитела с уникальными характеристиками [186]. Амплификация библиотек ДНК очевидно ведет к деградации их разнообразия, и применение эмульсионной ПЦР может препятствовать этому нежелательному эффекту, однако закономерности этих процессов остаются малоизученными.

### 1.5.3 Системы для рекомбинантной экспрессии однодоменных антител

Однодоменная структура и эффективный фолдинг нанотел позволяют задействовать широкий спектр экспрессионных систем для их получения. Примеры различных подходов для гетерологической экспрессии однодоменных антител рассмотрены в детальном обзоре [187]. Естественно, для получения однодоменных антител могут быть использованы клетки млекопитающих. Существует прекрасно разработанная биотехнология производства классических моноклональных антител в СНО. Преимуществом однодоменных антител является то, что в их случае возможно применение гораздо более простых организмов: бактерий, дрожжей и растений. За счет экспрессии в микроорганизмах и растениях можно достичь высокого уровня продуктивности при относительно невысокой стоимости технологического процесса.

Так, для получения однодоменных антител широко применяются обычные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и метилотрофные *Pichia pastoris*. Для данных микроорганизмов

существуют хорошо отработанные технологии секретионной экспрессии в среде, откуда потом легко можно выделить и очистить антитело. Типичные уровни экспрессии в таких системах составляют от 2 до 30 мг белка на литр культуры при росте в колбах [187]. В разработанном для *S. cerevisiae* индустриальном процессе при ферментации в реакторе объемом 15 м<sup>3</sup> было получено 1.3 килограмма однодоменного антитела, что соответствует продуктивности 90 мг на литр среды [188]. Получение однодоменных антител в дрожжах может быть затруднено нежелательным N- и O-гликозилированием [187]. Среди более экзотических систем можно отметить технологию получения однодоменного антитела к TNF $\alpha$  в зернах трансгенного риса [189]. Уровень продукции антитела в такой системе достигает 1.45% массы зерна, и полученный белок является функционально активным, что подтверждается его терапевтическим действием в модели артрита у мышей.

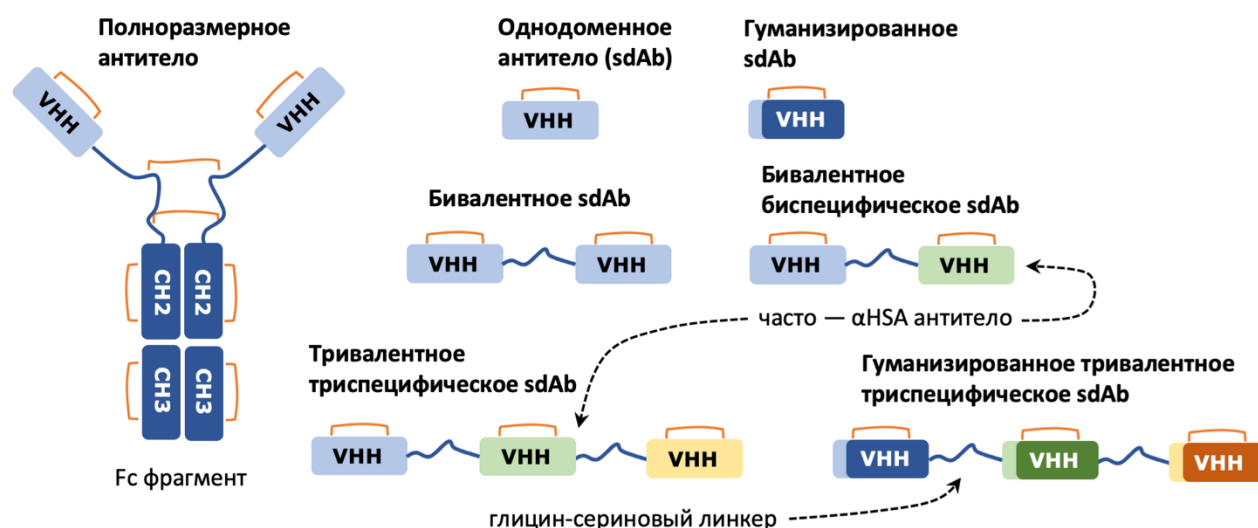
Вероятно, самой привлекательной технологией ввиду ее простоты и продуктивности является гетерологическая экспрессия однодоменных антител в бактериях. При этом обычная цитоплазматическая бактериальная экспрессия однодоменных антител затруднена из-за невозможности формирования дисульфидных связей в восстанавливающих условиях цитоплазмы. Традиционно однодоменные антитела экспрессировали в периплазме бактерий *Escherichia coli* [190], и данный подход долгое время оставался стандартным [178]. Периплазматическое пространство *E. coli* характеризуется окислительными условиями, что делает возможным формирование дисульфидных связей. Для обеспечения транспорта белка в периплазму на его N-конце располагается сигнальный пептид, распознаваемый компонентами SEC транслокона бактерий. Транслокация белка в периплазму идет котрансляционно, то есть одновременно с синтезом и до его фолдирования, при этом протеолитическая субъединица SEC удаляет сигнальный пептид. Попав в периплазму, синтезированный белок может фолдироваться с образованием дисульфидных связей, корректное замыкание которых обеспечивается дисульфид-изомеразой DsbC.

Экспрессия однодоменных антител в цитоплазме *E. coli* потенциально может быть более продуктивной ввиду большего объема цитоплазмы по сравнению с периплазмой. Более того, цитоплазматическая экспрессия не лимитирована пропускной способностью транслокона SEC. Для обеспечения возможности замыкания дисульфидных связей в цитоплазме были созданы генетически модифицированные штаммы *E. coli* с делециями генов редуктаз *trxB* и *gor*, имеющие окислительную цитоплазму, например Origami и SHuffle. Наиболее эффективным среди таких штаммов является *E. coli* SHuffle, помимо делеций *trxB* и *gor* также имеющий дополнительную копию гена DsbC без сигнального пептида [191]. Таким образом фермент DsbC в этих клетках локализуется в цитоплазме и обеспечивает эффективное формирование дисульфидных связей. Среди всех исследований по экспрессии однодоменных антител в бактериях наивысший уровень

продукции был достигнут при цитоплазматической экспрессии в *E. coli Shuffle* с использованием вектора pET-28b [192]. Для двух однодоменных антител к рецептору EGFR были получены уровни экспрессии более 100 мг на литр культуры. При использовании проприетарной ростовой среды EnPresso для одного из антител удалось даже достичь уровня 200 мг белка на литр культуры за счет достижения более высоких плотностей клеток. Данное исследование демонстрирует высокий потенциал применения прокариотических систем для получения рекомбинантных однодоменных антител.

### 1.5.4 Области и форматы терапевтического применения однодоменных антител

Благодаря своим уникальным свойствам, однодоменные антитела нашли множество применений в микроскопии, структурной биологии, биотехнологии и медицине [193]. В данном разделе акцент сделан на рассмотрении медицинских применений наиболее разработанных молекул. В детальном обзоре терапевтических однодоменных антител Steeland и соавторы привели более трехсот пятидесяти источников, описывающих более двухсот различных молекул [43]. Разумеется, только малая доля из них дошла до стадии клинических испытаний. Антитела, активно разрабатываемые в настоящее время или уже одобренные для терапевтического применения, приведены в таблице 2. Некоторые из примененных в них форматов инженерии терапевтических белков проиллюстрированы на рисунке 6.



**Рисунок 6** — Некоторые форматы терапевтических молекул на основе однодоменных антител. Однодоменные антитела идеально подходят для инженерии би- и триспецифических молекул. Часто в их структуре присутствует  $\alpha$ HSA антитело для увеличения времени циркуляции за счет взаимодействия с рецептором FcRn через HSA.



**Таблица 2** — Терапевтические препараты на основе однодоменных антител в стадии клинических исследований. Данные основаны на обзорах [43; 194] и приведены с изменениями и дополнениями с учетом актуальной информации из базы *clinicaltrials.gov*.

	Название	Мишень и Тип	Разработчик	Фаза испытаний	Область применения
<b>Гематология</b>	<b>Caplacizumab</b> (Cabliivi®, ALX-0081)	vWF, гуманизированное бивалентное sdAb	Ablynx	Одобрено FDA (2019)	Приобретенная тромботическая тромбоцитопеническая пурпура
<b>Иммунология</b>	<b>Ozoralizumab</b> (Nanozora®, ATN-103)	TNF $\alpha$ (2), HSA (1), гуманизированное тривалентное sdAb	Pfizer Ablynx	Одобрено Япония (2022)	Ревматоидный артрит
	Gefurulumab (ALXN1720)	C5, HSA, гуманизированное бивалентное sdAb	Alexion	Фаза III	Миастения, ингибирует комплемент (C5)
	Vobarilizumab (ALX-0061)	IL6R, HSA, гуманизированное бивалентное sdAb	Ablynx	Фаза IIb	Ревматоидный артрит, системная красная волчанка
	ATN-192	TNF $\alpha$ (2), HSA (1), ПЭГилированный вариант ATN-103	Ablynx	Фаза I	Ревматоидный артрит
	Sonelokimab (M1095, ALX-0761)	IL17A, IL17F, HSA, гуманизированное тривалентное sdAb	MoonLake Merck Ablynx	Фаза IIb	Псориаз
	M6495	ADAMTS5, HSA, бивалентное sdAb	Novartis Merck	Фаза I	Остеоартрит
	V565	TNF $\alpha$ , моновалентное sdAb	VHsquared	Фаза II	Болезнь Крона
<b>Инфекции</b>	ALX-0171	F-белок RSV, тривалентное sdAb	Ablynx	Фаза IIb	Инфекция респираторно-синцитиальным вирусом
	LMN-101	<i>Campylobacter jejuni</i> , смесь разных sdAb	Lumen Bioscience	Фаза II	Кампилобактериоз
	ARP1	Ротавирус, моновалентное sdAb в зернах трансгенного риса	CDDR, Bangladesh	Фаза II	Диаррея
<b>Онкология</b>	<sup>131</sup> I-GMIB- $\alpha$ HER2-VHH1	HER2, моновалентное sdAb, радиоконъюгат с <sup>131</sup> I	Precirix	Фаза I	Рак молочной железы
	<sup>68</sup> Ga-NOTA- $\alpha$ HER2-VHH1	HER2, моновалентное sdAb, радиоконъюгат с <sup>68</sup> Ga	Universitair Ziekenhuis Brussel	Фаза II	Диагностика HER2 <sup>+</sup> рака молочной железы

Несмотря на все преимущества однодоменных антител и множество перспективных кандидатов, более четверти века ни один из них не мог достичь одобрения в качестве лекарственного средства. Отсутствие успешных примеров сдерживало развитие данной области молекулярной иммунологии. Ситуация кардинально поменялась в 2019 году с одобрением FDA каплацизумаба (Кабливи®), первого терапевтического препарата, основанного на антителах верблюдовых. Каплацизумаб является бивалентным моноспецифическим антителом, состоящим из двух соединенных линкером гуманизованных однодоменных антител к фактору фон Виллебранда (vWF). Фактор фон Виллебранда является триггером развития тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Недостаток протеазы ADAMTS13 у пациентов ведет к накоплению vWF, который связывается с тромбоцитами и стимулирует тромбоз. Каплацизумаб связывается с vWF и блокирует его взаимодействие с тромбоцитами. В клиническом исследовании каплацизумаб привел к трехкратному уменьшению рецидивов заболевания у пациентов по сравнению со стандартным лечением, плазмаферезом [46]. Данное антитело стало первым лекарством для тромботической тромбоцитопенической пурпуры.

Как видно из таблицы 2, препараты на основе однодоменных антител активно разрабатываются для применения в иммунологии. Один из таких препаратов, озорализумаб, в 2022 году стал вторым одобренным для лечебного применения антителом верблюдовых. Озорализумаб ингибирует цитокин TNF $\alpha$  и назначается при ревматоидном артрите. При разработке данного препарата использован формат, типичный для многих терапевтических молекул данного класса. Озорализумаб является тривалентным биспецифическим антителом, составленным из двух одинаковых гуманизованных однодоменных антител к TNF $\alpha$  и одного гуманизованного однодоменного антитела к альбумину человека, HSA. Два антитела к TNF $\alpha$  обеспечивают более сильное ингибирование про-воспалительной сигнализации, а антитело к HSA позволяет увеличить время выведения препарата за счет рециркуляции через взаимодействие с HSA и рецептором FcRn.

Нестандартной областью применения для моноклональных антител являются инфекционные заболевания, и здесь также проявляются преимущества однодоменных антител. В последнее время развивается область разработки принимаемых перорально однодоменных антител для борьбы с кишечными инфекциями [195]. Путем внесения определенных мутаций VHH фрагменты могут быть оптимизированы для снижения протеолиза, и пройти желудок и двенадцатиперстную кишку с сохранением активности. Более того, антитела для перорального применения не требуют гуманизации. Во второй фазе клинических испытаний находятся два препарата для лечения кишечных инфекций, LMN-101 и ARP1. Причем в случае ARP1 в качестве системы экспрессии и одновременно носителя для однодоменного антитела используются зерна трансгенного риса [196]. Однодоменные антитела могут быть доставлены в легкие при помощи

небулайзера, вследствие чего возможно их применение в аэрозольной форме для лечения инфекций дыхательной системы. Так, на поздних стадиях разработки находится тривалентное антитело ALX-0171 для лечения инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом (RSV). В клиническом исследовании на детях с RSV было показано, что ALX-0171 ведет к практически двукратному ускорению снижения вирусной нагрузки, но при этом не улучшает клиническую картину [197].

Пандемия COVID-19 стимулировала разработку терапевтических однодоменных антител к вирусу SARS-CoV-2. Сразу несколько научных групп получили высокоаффинные антитела к различным эпитопам S-белка коронавируса, эффективно блокирующие инфицирование клеток. В одном таком исследовании путем иммунизации лам и трансгенных мышей было получено 6 антител с моновалентными аффинностями в диапазоне 3–30 нМ и  $IC_{50}$  нейтрализации вируса 0.3–7 нМ [198]. Переформатирование отобранных VHH в полноразмерные антитела с тривалентными вариабельными фрагментами улучшило нейтрализацию вируса до 12–91 пМ. Другое однодоменное антитело к вирусу SARS-CoV-2 было переформатировано в гомотример и способно нейтрализовывать вирус с эффективной концентрацией 1 пМ [199]. Перевод антитела в аэрозольную форму никак не сказывался на его нейтрализующей способности, и получавшие аэрозольное антитело животные с инфекцией COVID-19 имели значительно меньшие титры вируса и поражения легких по результатам гистологии.

Приведенные исследования демонстрируют, что препараты на основе однодоменных антител могут применяться как в стандартных для классических моноклональных антител областях, например гематологии, иммунологии и онкологии, так и прежде нетипичных для антител формах лекарств для перорального приема или аэрозолей для лечения инфекционных заболеваний. Уникальные свойства однодоменных антител, возможности инженерии мультимерных и мультиспецифичных терапевтических молекул и простота их биотехнологического производства делают этот особый тип антител уникальным инструментом для иммунотерапии самых разнообразных заболеваний.

---

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы

#### 2.1.1 Реагенты и расходные материалы

Все химические реагенты для приготовления буферных растворов, индукторы экспрессии изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) и *L*-рамноза были приобретены в компании Panreac (Applichem). Для полиакриламидного гель-электрофореза использовались реагенты и расходные материалы производства Bio-Rad. Проявка белков с гистиридиновыми тагами при вестерн-блоттинге проводилась при помощи HisProbe-HRP конъюгата производства Thermo Scientific. Реагенты для полимеразной цепной реакции, все необходимые эндонуклеазы рестрикции и фермент для дегликозилирования пептид-N-гликозидаза F (PNGаза F) были приобретены в компании New England Biolabs. Бактериальные ростовые среды TB и LB были приготовлены из триптона и дрожжевого экстракта BD Vacto. Для культивации клеток млекопитающих использовались ростовые среды HyCell TransFх-С и HyClone DMEM с добавлением фетальной сыворотки HyClone FBS производства компании GE Healthcare (в настоящее время Cytiva). Рекомбинантный человеческий херегулин  $\beta$ 1 был приобретен в компании BioVision (кат. № 4711). Для экспериментов с терапевтическим антителом к рецептору трастузумабом использовался оригинальный препарат Герцептин<sup>®</sup> производства Roche. В качестве отрицательного контроля в ряде экспериментов использовалось терапевтическое антитело к CD20 ритуксимаб в виде препарата Реддитукс<sup>®</sup> (Dr. Reddy's). Для фильтрации и стерилизации некоторых растворов использовались нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0.45 и 0.22 мкм производства Millipore. Концентрирование белковых растворов проводилось на центрифужных концентраторах Amicon (Millipore). Аффинная хроматография белков с С-тагом (С-концевой пептид ЕРЕА, глутаминовая кислота – пролин – глутаминовая кислота – аланин) проводилась с использованием сорбента Affinity CaptureSelect C-tag компании Thermo Fisher. Для очистки белков с гистиридиновыми тагами методом металл-хелатной хроматографии использовались колонки сOmplete объемом 1 мл и 5 мл (Roche), колонки HisTrap HP объемом 1 мл (GE Healthcare, сейчас Cytiva) и сорбент Ni-NTA (Qiagen). Ионообменная хроматография высокого разрешения проводилась на колонках MonoQ 10/100 GL and MonoS 5/50 GL, а для гель-фильтрации использовались колонки Superdex 75 Increase 10/300, HiLoad 16/600 Superdex 200pg, и калибровочные стандарты молекулярных масс белков LMW Standards (GE Healthcare, сейчас Cytiva). Для расщепления химерных белков использовалась протеаза TEVpM2 [200], протокол выделения и очистки которой приведен далее. Реагент Элмана (кат. № D8130), краситель Hoechst 33342 а также детергенты и масла для эмульсионной ПЦР приобретены в компании

Sigma Aldrich. Флуоресцентные красители для конъюгации с белками, AF488 и sulfo-Cyanine5, приобретены в компании Люмипроб, а для определения пролиферации клеток использован реагент MTS производства BioVision (кат. № 2808). Для поверхностного плазмонного резонанса использованы реагенты и сенсорные чипы CM5 компании GE Healthcare (Cytiva).

### 2.1.2 Штаммы бактерий и клеточные культуры

Для получения плазмидной ДНК при молекулярном клонировании использовался стандартный штамм *Escherichia coli* XL-1 Blue (Евроген). В случае клонирования в векторы pSol (Lucigen) без рестрикции и лигирования использовался специальный штамм *E. coli* 10G компании Lucigen в соответствии с руководством производителя. Для гетерологической экспрессии однодоменных антител в бактериях использовался стандартный экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3) с геном T7 РНК полимеразы в  $\lambda$  профаге и делециями генов протеаз Iop и OmpT, полученный из компании Евроген. Для цитоплазматической бактериальной экспрессии применен подробно описанный в разделе 1.5.3 штамм *E. coli* SHuffle T7 Express (далее в тексте именуемый просто SHuffle), приобретенный в компании New England Biolabs.

Для экспрессии фрагментов рецептора ErbB3 в эукариотической системе использовались клетки китайского хомячка CHO штамма CHO-T-НС (Биокад). Исследования клеточных эффектов однодоменных антител проводились на трех линиях клеток рака молочной железы с различной экспрессией рецептора эстрогена (ER), HER2 и ErbB3. Используются следующие клеточные линии: MCF7 (ER<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup>, ErbB3<sup>+</sup>), полученная из клеточного банка Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, BT474 (ER<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup>, ErbB3<sup>+</sup>), полученная из НМИЦ Онкологии им. Н. Н. Петрова, г. Санкт-Петербург, и SK-BR-3 (ER<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup>, ErbB3<sup>+</sup>), полученная из компании Биокад. Также в экспериментах использованы экспрессирующие HER2 и ErbB3 клетки гепатоцеллюлярной аденокарциномы Hep G2. В качестве отрицательного контроля применены линия клеток хронического миелоидного лейкоза K562 и линия HeLa, не экспрессирующие HER2 и ErbB3. Все три упомянутые клеточные линии получены из клеточного банка Института цитологии РАН.

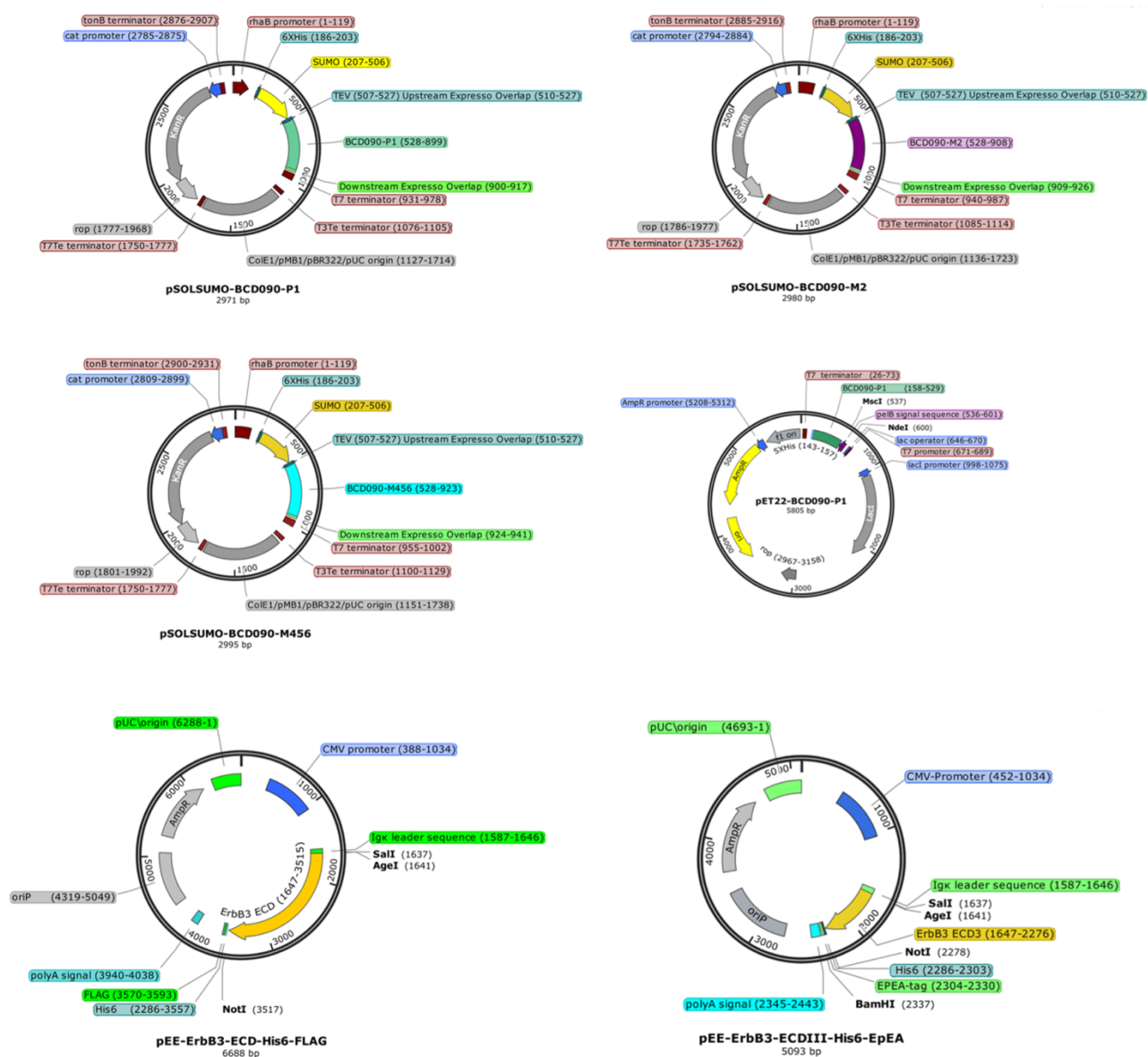
## 2.2 Молекулярное клонирование и секвенирование

### 2.2.1 Создание генетических конструкций

Все созданные в рамках данного исследования экспрессионные векторы приведены в таблице 3, а карты плазмид изображены на рисунке 7. Для цитоплазматической бактериальной экспрессии однодоменных антител был использован вектор pSolSUMO (Lucigen). Кодирование антитела фрагменты ДНК были амплифицированы при помощи ПЦР с длинными олигонуклеотидными праймерами, имеющими на 5' концах гомологичные вектору участки, и смешаны с линейризованным вектором pSolSUMO. Полученные смеси использованы для трансформации хемикомпетентных клеток *E. coli* 10G согласно руководству производителя.

**Таблица 3** — Характеристики плазмид, созданных для экспрессии однодоменных антител и фрагментов рецептора ErbB3.

Название плазмиды	Белок	Молекулярный таг	Химерный белок и Сигнальный пептид
<b>Плазмиды для бактериальной экспрессии</b>			
pSolSUMO-BCD090-P1	BCD090-P1	His <sub>6</sub> , N-конец	Белок SUMO, N-конец Сайт TEV протеазы
pSolSUMO-BCD090-M2	BCD090-M2	His <sub>6</sub> , N-конец	Белок SUMO, N-конец Сайт TEV протеазы
pSolSUMO-BCD090-M456	BCD090-M456	His <sub>6</sub> , N-конец	Белок SUMO, N-конец Сайт TEV протеазы
pET22-BCD090-P1	BCD090-P1	His <sub>5</sub> , C-конец	Сигнальный пептид relB на N-конце
<b>Плазмиды для эукариотической экспрессии</b>			
pEE-ErbB3-ECD-His <sub>6</sub> -FLAG	ErbB3 ECD внеклеточный домен	His <sub>6</sub> FLAG-таг оба на C-конце	Igк сигнальный пептид на N-конце
pEE-ErbB3-ECD <sup>III</sup> -His <sub>6</sub> -EPEA	ErbB3 ECD <sup>III</sup> субдомен III	His <sub>6</sub> EPEA (C-таг) оба на C-конце	Igк сигнальный пептид на N-конце



**Рисунок 7** — Карты экспрессионных плазмид, созданных в ходе данной работы. Отмечены гены устойчивости к антибиотикам (*KanR*, *AmpR*), промоторы (*rhaB*, *T7*, *CMV*), молекулярные таги (*His<sub>6</sub>*, *His<sub>5</sub>*, *FLAG*, *EPEA*), белок *SUMO* и сайт *TEV* протеазы, использованные при клонировании сайты рестрикции. В скобках указаны номера нуклеотидов, кодирующих указанный элемент. Карты созданы в программе *SnapGene*.

Для периплазматической экспрессии был использован вектор pET22b (Novagen) который имеет кодирующую сигнальный пептид *pelB* последовательность на N-конце и гистидиновый таг на C-конце рамки считывания. Кодированный однодоменный антитело BCD090-P1 фрагмент ДНК был амплифицирован при помощи ПЦР с праймерами, имеющими гомологичные вектору pET22b участки. Затем полученный фрагмент, т. н. «мегапраймер», был клонирован в вектор pET22b без рестрикции и лигирования при помощи второй интеграционной ПЦР [201]. Реакционная смесь была обработана рестриктазой *DpnI* для удаления исходного

метирированного вектора рЕТ22b и затем использована для трансформации высококомпетентных клеток *E. coli XL-1 Blue*, приготовленных по методу Иноуэ [202].

Для эукариотической экспрессии внеклеточного домена рецептора ErbB3 (эктодомен, ECD: аминокислотные остатки 21–643) и субдомена III (ECD<sup>III</sup>: аминокислотные остатки 329–532) были созданы генетические конструкции на основе вектора рЕЕ, имеющего hCMV промотор и Igκ сигнальный пептид для секреции белка в культуральную среду. Кодированный ECD фрагмент был клонирован в рЕЕ с использованием рестрикционных сайтов SalI и NotI. Аналогично, кодируемый ECD<sup>III</sup> фрагмент был амплифицирован с праймерами, кодирующими сайты рестрикции и С-концевые His<sub>6</sub> и EPEA таги, и клонирован по сайтам SalI и BamHI. Аминокислотные последовательности всех экспрессируемых белков приведены в таблице 4.

**Таблица 4** — Аминокислотные последовательности экспрессируемых белков. Синим цветом отмечены последовательности однодоменных антител и фрагментов рецептора ErbB3. Подчеркнуты последовательности молекулярных тагов, сайта TEV протеазы и pelB.

Название плазмиды	Аминокислотная последовательность белка					
<b>Плазмиды для бактериальной экспрессии</b>						
pSolSUMO-BCD090-P1	10	20	30	40	50	60
	<u>MHHHHHH</u> MGS	LQDSEVNQEA	KPEVKPEVKP	ETHINLKVSD	GSSEIFFKIK	KTTPLRRLME
	70	80	90	100	110	120
	AFAKRQ GKEM	DSLTFLYDGI	EIQADQTPED	LDMEDNDIIE	AHREQIGGEN	<u>LYFQGEVQLV</u>
	130	140	150	160	170	180
	QSGGGLVQPG	GSLRLSCAAS	GRTSSKYAMG	WFRQAPGKGT	EFVATISWSD	GSTYYADSVK
	190	200	210	220	230	
GRFTISRDN	KNTVYLQMS	LKPEDTAVYY	CAAAVDVLAG	TFEYDYDYG	QGTTLVTVSS	
pSolSUMO-BCD090-M2	10	20	30	40	50	60
	<u>MHHHHHH</u> MGS	LQDSEVNQEA	KPEVKPEVKP	ETHINLKVSD	GSSEIFFKIK	KTTPLRRLME
	70	80	90	100	110	120
	AFAKRQ GKEM	DSLTFLYDGI	EIQADQTPED	LDMEDNDIIE	AHREQIGGEN	<u>LYFQGVQQLV</u>
	130	140	150	160	170	180
	QSGGGLVQAG	GSLRLSCAFS	GRTFSMYTMG	WFRQAPGKER	EFVAANRGRG	LSPDIADSVN
	190	200	210	220	230	240
GRFTISRDN	KNTLYLQMS	LKPEDTAVYY	CAADLQYGSS	WPQRSSAEYD	YWGQGTTVTV	
pSolSUMO-BCD090-M456	10	20	30	40	50	60
	<u>MHHHHHH</u> MGS	LQDSEVNQEA	KPEVKPEVKP	ETHINLKVSD	GSSEIFFKIK	KTTPLRRLME
	70	80	90	100	110	120
	AFAKRQ GKEM	DSLTFLYDGI	EIQADQTPED	LDMEDNDIIE	AHREQIGGEN	<u>LYFQGVQQLV</u>
	130	140	150	160	170	180
	QSGGGLVQSG	GSLKLSCVAS	GGPFSTYLMG	WFRQAPGKER	EFVTAISRSG	LNTYYADSVK
	190	200	210	220	230	240
GRFTISRDN	KNTVYLQMS	LKPEDTAVYH	CAARRGGTNS	GSYYFDRPAV	SDEYDLWGQG	
pET22-BCD090-P1	10	20	30	40	50	60
	<u>MKYLPTAA</u>	<u>GLLLLAAQPA</u>	<u>MAMA</u> EVQLVQ	SGGGLVQPGG	SLRLSCAASG	RTSSKYAMGW
	70	80	90	100	110	120
	FRQAPGKGT	FVATISWSDG	STYYADSVK	RFTISRDN	NTVYLQMSL	KPEDTAVYYC



	130	140	150			
	AAAVDVL	AGT FEY	EYDYWGQ	GTLVTVSS	<u>HH</u>	<u>HHH</u>
<b>Плазмиды для эукариотической экспрессии</b>						
pEE-ErbB3- ECD-His <sub>6</sub> - FLAG	10	20	30	40	50	60
	EVGNSQAVCP	GTLNGLSVTG	DAENQYQTLY	KLYERCEVVM	GNLEIVLTGH	NADLSFLQWI
	70	80	90	100	110	120
	REVTGYVLVA	MNEFSTLPLP	NLRVVRGTQV	YDGKFAIFVM	LNyntnSSHA	LRQLRLTQLT
	130	140	150	160	170	180
	EILSGGVYIE	KNDKLCHMDT	IDWRDIVRDR	DAEIVVKDNG	RSCPPCHEVC	KGRCWGPGE
	190	200	210	220	230	240
	DCQTLTKTIC	APQCNGHCFG	PNPNQCCHDE	CAGGCSGPQD	TDCFACRHFN	DSGACVPRCP
	250	260	270	280	290	300
	QPLVYNKLTf	QLEPNPHTKY	QYGGVCVASC	PHNFVVDQTS	CVRACPPDKM	EVDKNGLKMC
	310	320	330	340	350	360
	EPCGGLCPKA	CEGTGSGSRF	QTVDSSNIDG	FVNCTKILGN	LDFLITGLNG	DPWHKIPALD
	370	380	390	400	410	420
	PEKLNVFRTV	REITGYLNIQ	SWPPHMHNFs	VFSNLTTIGG	RSLYNRGFSL	LIMKNLNVTS
	430	440	450	460	470	480
	LGFRSLKEIS	AGRIYISANR	QLCYHHSLNW	TKVLRGPTEE	RLDIKHNSPR	RDCVAEGKVC
	490	500	510	520	530	540
	DPLCSSGGCW	GPGPGQCLSC	RNYSRGGVCV	THCNFLNGEP	REFAHEAECF	SCHPECQPME
	550	560	570	580	590	600
	GTATCNGSGS	DTCAQCAHFR	DGPHCVSSCP	HGVLGAKGPI	YKYPDVQNEC	RPCHENCTQG
	610	620	630	640		
	CKGPELQDCL	GQTLVLIGKT	HLTAAAGGGE	<u>SHHHHHH</u> GDI	<u>LDYKDDDDK</u>	
pEE-ErbB3- ECD <sup>III</sup> -His <sub>6</sub> - EPEA	10	20	30	40	50	60
	SGDKACEGTG	SGSRFQTVDS	SNIDGFVNCT	KILGNLDFLI	TGLNGDPWHK	IPALDPEKLN
	70	80	90	100	110	120
	VFRTVREITG	YLNIQSWPPH	MHNFSVFSNL	TTIGGRSLYN	RGFSLIMKN	LNVTSLGFRS
	130	140	150	160	170	180
	LKEISAGRIY	ISANRQLCYH	HSLNWTKVLr	GPTEERLDIK	HNRPRRDCVA	EGKVC DPLCS
	190	200	210	220		
	SGGCWGP GPG	QCLSCRNYSR	GGVCVTHGNS	AAA <u>HHHHHHH</u> G	YQDY <u>EPEA</u>	

Для расщепления химерных белков использовалась мутантная TEV протеаза под названием TEVpM2, разработанная Wei и соавторами [200]. Известно, что TEV протеаза дикого типа претерпевает ауто-инактивацию при хранении, которую удается подавить при помощи замены S219V. Мутант TEVpM2 имеет замену S219V и еще пять мутаций (T17S, L56V, N68D, I77V, S135G), которые значительно улучшают стабильность белка и увеличивают уровень экспрессии в *E. coli*. Для экспрессии TEVpM2 была создана конструкция на основе вектора pSol-His<sub>6</sub> (Lucigen), аналогичного векторам для однодоменных антител, но не имеющего кодирующего белок SUMO участка. Кодирующий TEVpM2 фрагмент с N-концевым гистидиновым тагом был амплифицирован при помощи ПЦР с оригинальной плазмиды pET28 Wei и соавторов с использованием длинных праймеров, имеющих перекрытие с вектором pSol-His<sub>6</sub>. Полученный фрагмент был смешан с линейризованным вектором pSol-His<sub>6</sub> и использован для трансформации хемикомпетентных клеток *E. coli* 10G в соответствии с рекомендациями производителя.

### 2.2.2 Секвенирование и анализ данных

Все плазмиды были получены в *E. coli XL-1 Blue*, очищены и секвенированы по Сэнгеру перед дальнейшими экспериментами. Кодрующие рекомбинантные белки последовательности проверены на соответствие заданным, и использованы не имеющие мутаций клоны. Сиквенсы плазмид были аннотированы в программе SnapGene для построения карт, представленных на рисунке 7.

Для анализа амплификации сложной библиотеки фрагментов ДНК был применен высокопроизводительный метод секвенирования следующего поколения (NGS). Продукты ПЦР были очищены при помощи электрофореза в полиакриламидном геле, после чего 5 нг продукта были лигированы со специальными адаптерами с использованием набора NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). Затем образцы были смешаны в эквимоллярных концентрациях и секвенированы на приборе Miseq (Illumina) с использованием набора для секвенирования парных ридов ( $2 \times 300$  нуклеотидов) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для анализа данных был разработан скрипт на *Python*, использующий функции из стандартного пакета *biopython* [203], а также библиотеки *seqtk* и *htslib* [204] с интерфейсом *pysam*, для чтения файлов формата FASTA, FASTQ и SAM. На первом этапе анализа при помощи программы *cutadapt* [205] в полученных в результате секвенирования парных ридов R1 и R2 были идентифицированы 5' адаптер (5'-CCCAGCCGGCCATGGCC-3') и связанный с ним 3' адаптер (5'-GCTAGCAGTGGTGGAGGCGG-3'), а также их обратные комплементы. Использовались только риды с адаптерами без делеций и инсерций, содержащие не более 6 ошибок. Адаптер на 5' конце был обязателен и должен был располагаться точно в начале рида, в противном случае рид считался некачественным и исключался из анализа. Соответствующие критериям риды с адаптерами были отобраны для дальнейшего анализа, который проводился уже на их центральных фрагментах (N)<sub>132</sub>. Для каждой пары прямого (R1) и обратного (R2) рида была создана консенсусная последовательность. В тех позициях, где прямой и обратный рид имели различные нуклеотиды, выбирался тот, у которого было выше качество прочтения в соответствии с данными из исходного FASTQ файла. Если количество расхождений между двумя ридами превышало 10%, такие риды признавались некачественными и исключались из анализа. Только консенсусные последовательности длиной  $132 \pm 3$  нуклеотида использовались для дальнейшего выравнивания с исходной библиотекой и анализа ошибок амплификации.

Высококачественные консенсусные последовательности после удаления адаптеров были картированы на исходную ДНК библиотеку при помощи программы *minimap2* [206] для того, чтобы однозначно сопоставить каждое прочтение с элементом библиотеки. Полученные пары

последовательностей применялись для построения парных выравниваний по алгоритму Смита-Ватермана при помощи пакета *SSW* [207]. Парные выравнивания затем использовались для подсчета количества ридов с различными типами ошибок, например имеющих только инсерции, только делеции, только мутации или смешанные типы ошибок. Дальнейший статистический анализ ошибок для сравнения эффективности различных способов амплификации библиотеки ДНК проводился в пакете *GraphPad Prism*.

## 2.3 Экспрессия и очистка рекомбинантных белков

### 2.3.1 Бактериальная экспрессия однодоменных антител

Для цитоплазматической экспрессии однодоменных антител использовались бактерии *E. coli BL21(DE3)* и *E. coli SHuffle*. Хемикомпетентные клетки трансформировались каждым из векторов pSolSUMO и высевались на чашки Петри с LB агаром (1.5% агара, 1.0% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта и 1.0% NaCl) и канамицином. Одиночные колонии после селекции использовались для инокуляции ночной культуры. На следующий день 1–4 литра среды Terrific Broth (ТВ, 2.0% триптона, 2.4% дрожжевого экстракта, 0.4% глицерина, 17 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 72 мМ К<sub>2</sub>НРO<sub>4</sub> рН 7.2) с 50 мкг/мл канамицина инокулировались 1:100 объема ночной культуры и бактерии росли при 37 °С и постоянном перемешивании 200–220 об/мин в орбитальном шейкере Innova 44R (Eppendorf). Рост проводился в 2 л колбах, заполненных не более чем на 500 мл. После достижения культурами оптической плотности OD<sub>600</sub> 0.6–0.8 проводилась индукция экспрессии белка добавлением *L*-рамнозы до конечной концентрации 5–10 мМ, температура понижалась до 27–29 °С и клетки росли ночью в течение 14 часов. Затем бактерии осаждались центрифугированием в течение 5 минут при 10 000 g и перерастворялись в буфере IMAC (50 мМ Na<sub>2</sub>НРO<sub>4</sub> рН 8.0, 0.3 М NaCl) с 1 мМ PMSF, 1 мМ EDTA и 1 мМ бензамидина в качестве ингибиторов протеаз.

Лизис бактерий осуществлялся при помощи ультразвукового гомогенизатора в течение 10 минут (мощность 50 Вт, пульсы 15 сек) на льду, и разрушенные клетки осаждались центрифугированием при 40 000 g в течение 20 минут. Белки в экстракте преципитировались медленным добавлением сульфата аммония до 70% насыщения с постоянным перемешиванием при 4 °С. Преципитированные белки осаждались центрифугированием при 40 000 g в течение 10 минут и растворялись в 50 мл буфера IMAC. Раствор дополнительно диализовался против буфера IMAC, после чего рН доводился до 8.0, и добавлялся имидазол до конечной концентрации 5 мМ. Раствор фильтровался через 0.45 и 0.22 мкм мембраны и загружался на предварительно эквивилиброванную 1 мл либо 5 мл колонку сOmplete для металл-хелатной хроматографии при помощи перистальтического насоса. После промывки колонки 20 объемами буфера IMAC,

целевой белок элюировался при помощи 10 мл буфера IMAC с 0.3 М имидазола. Затем проводился анализ фракций путем электрофореза в полиакриламидном геле.

Использованная для расщепления химерного белка протеаза TEVpM2 была экспрессирована в *E. coli BL21(DE3)* и очищена при помощи металл-хелатной хроматографии по протоколу, аналогичному описанному выше для однодоменных антител. Для проведения реакции протеолиза растворы очищенных химерных белков были сначала диализованы против буфера TEV (30 мМ Tris pH 8.0, 0.5 мМ EDTA, 1 мМ DTT) при 4 °С, а затем смешаны с TEVpM2 в молярном соотношении от 40:1 до 80:1 и инкубированы в течение 4 часов при комнатной температуре с перемешиванием. Белок SUMO и TEVpM2 с гистидиновыми тагами были убраны из образцов при помощи негативной металл-хелатной хроматографии с Ni-NTA сорбентом. Образцы в буфере с 50 мМ NaCl и 5 мМ имидазола смешивались с 200 мкл сорбента, инкубировались 30 минут при 4 °С, после чего сорбент удалялся коротким центрифугированием. После трехкратного повторения данной процедуры образцы анализировались при помощи гель-электрофореза и затем дополнительно очищались на финальном этапе хроматографии.

Финальная очистка препаратов однодоменных антител проводилась при помощи ионообменной хроматографии высокого разрешения на приборе NGC Discover (BioRad). Образцы тщательно диализовались против буфера с низкой ионной силой, 20 мМ Tris pH 8.0 (для MonoQ) или 20 мМ ацетат натрия pH 6.0 (для MonoS). Антитела были сорбированы на анионообменную колонку MonoQ (BCD090-P1) либо катионообменную колонку MonoS (BCD090-M2 и BCD090-M456), промыты десятью объемами буфера и затем элюированы градиентом 0–0.6 М NaCl длиной тридцать объемов колонки со сбором фракций ½ объема колонки. Фракции были проанализированы при помощи гель-электрофореза, объединены и сконцентрированы при помощи 10 кДа центрифужных концентраторов Amicon. Концентрации однодоменных антител были определены спектрофотометрически с параметрами, рассчитанными в программе *ProtParam* и приведенными в таблице 5.

Для периплазматической экспрессии однодоменного антитела BCD090-P1 хемикомпетентные бактерии *E. coli BL21(DE3)* трансформировались плазмидой pET22-BCD090-P1 и высевались на чашки Петри с LB агаром и ампициллином. Одиночные колонии после селекции использовались для инокуляции ночной культуры. На следующий день 10 мл ночной культуры использовались для инокуляции 1 литра среды TB содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Клетки росли в колбах объемом 2 литра с не более чем 500 мл среды на каждую колбу при температуре 37 °С и постоянном перемешивании в орбитальном шейкере Innova 44R (Eppendorf) при 200–220 об/мин. При оптической плотности культур  $OD_{600} = 0.8–1.0$  проводилась индукция синтеза белка путем добавления IPTG до конечной концентрации 0.1 мМ, после чего культивирование клеток продолжалось 5 часов при температуре 30 °С. Периплазматическая

фракция выделялась по классическому протоколу холодного осмотического шока, разработанному Nossal & Neppel [208]. Клетки были собраны центрифугированием при 4 000 g в течение 10 мин и перерастворены в 80 мл раствора А с высокой осмолярностью: 50 мМ Tris pH 8.0, 20% сахара, 0.1 мМ EDTA. После 10-минутной инкубации при комнатной температуре в растворе А клетки были осаждены центрифугированием при 12 500 g в течение 15 минут, супернатант А был отобран, а клеточный осадок перерастворен в ледяном растворе В с низкой осмолярностью: 0.5 мМ MgSO<sub>4</sub>. После 10-минутной инкубации на льду, клетки были снова осаждены центрифугированием при 12 500 g в течение 15 минут. Содержащие периплазматическую фракцию супернатанты А и В были объединены и использованы для очистки однодоменного антитела аналогично тому, как описано выше для цитоплазматической экспрессии.

*Таблица 5 — Физико-химические параметры однодоменных антител и фрагментов рецептора ErbB3. Молекулярные массы рассчитаны для полностью редуцированных форм (S–H) и форм с дисульфидными связями (S–S).*

Белок	$\epsilon_{280}$ , M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pI	Формула	Мол. масса (ср.), Да	
			S–H	S–H	S–S
BCD090-P1	30·10 <sup>3</sup>	4.76	C <sub>594</sub> H <sub>898</sub> N <sub>156</sub> O <sub>192</sub> S <sub>4</sub>	13424.7	13422.7
BCD090-M2	27·10 <sup>3</sup>	7.96	C <sub>609</sub> H <sub>932</sub> N <sub>174</sub> O <sub>194</sub> S <sub>5</sub>	13955.3	13953.3
BCD090-M456	23·10 <sup>3</sup>	8.96	C <sub>632</sub> H <sub>973</sub> N <sub>179</sub> O <sub>198</sub> S <sub>4</sub>	14374.9	14372.8
pelB-BCD090-P1-His <sub>5</sub>	31.5·10 <sup>3</sup>	6.17	C <sub>733</sub> H <sub>1116</sub> N <sub>196</sub> O <sub>223</sub> S <sub>7</sub>	16466.4	16464.4
ECD-His <sub>6</sub> -FLAG	68.4·10 <sup>3</sup>	6.24	C <sub>3072</sub> H <sub>4769</sub> N <sub>899</sub> O <sub>946</sub> S <sub>59</sub>	71323.1	71272.7
ECD <sup>III</sup> -His <sub>6</sub> -EPEA	33·10 <sup>3</sup>	8.69	C <sub>1102</sub> H <sub>1705</sub> N <sub>333</sub> O <sub>327</sub> S <sub>12</sub>	25235.2	25225.1

### 2.3.2 Экспрессия фрагментов рецептора ErbB3 в клетках млекопитающих

Фрагменты рецептора ErbB3 были получены в клетках китайского хомячка CHO-T-НС, которые были временно трансфицированы описанными выше векторами рЕЕ при помощи полиэтиленимина. Для каждого из белков был выращен 1 литр культуры трансфицированных клеток в ростовой среде NuCell TransFx-C. Рост проводился в колбах в орбитальном шейкере-инкубаторе с увлажненным воздухом и 5% CO<sub>2</sub>. Первый день клетки росли при температуре 37 °С, затем температура понижалась до 32 °С и культивация продолжалась в течение еще 8 дней. После окончания культивации культуральная жидкость была очищена от клеток центрифугированием при 2 000 g в течение 10 минут и дополнительно подвергнута стерильной

филтрации через фильтрующие насадки Optiscar XL, после чего использована для выделения белка.

Эктодомен рецептора ErbB3 выделялся из кондиционированной среды при помощи металл-хелатной хроматографии на 1 мл колонках HisTrap. В культуральную жидкость после филтрации добавлялся  $\text{NiCl}_2$  до концентрации 1 мМ и имидазол до концентрации 10 мМ, рН доводился до 8.0. После нанесения образца колонка промывалась 10 мл буфера IMAC и белок ECD элюировался буфером IMAC с добавлением 0.3 М имидазола. На втором этапе очистки проводилась препаративная гель-филтрация на колонке Superdex 200pg. Элюат после металл-хелатной хроматографии наносился на предварительно эквилиброванную буфером PBS колонку Superdex 200pg. После хроматографического разделения соответствующие основному пику фракции объединялись и концентрировались на 10 кДа центрифужных концентраторах Amicon.

Субдомен III экспрессирован в клетках CHO-T-НС аналогично ECD и затем выделен из культуральной среды при помощи аффинной хроматографии на сорбенте CaptureSelect C-tag, связывающем EPEA таг в белке. Интересно отметить, что данный сорбент основан на однодоменном антителе, высокоаффинно взаимодействующем с тетрапептидом EPEA, что демонстрирует потенциал биотехнологического применения нанотел. Кондиционированная среда после филтрации наносилась на аффинную колонку, которая затем промывалась 5 объемами PBS. Белок ECD<sup>III</sup> элюировался 20 мМ цитратом натрия рН 3.0 с немедленной нейтрализацией добавлением раствора 1 М Tris рН 8.0, 1 М NaCl. Очищенный ECD<sup>III</sup> диализовался против PBS и был стерилизован филтрацией через 0.22 мкм мембрану.

## 2.4 Анализ структуры и стабильности однодоменных антител

### 2.4.1 Анализ спектров кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма были измерены на приборе Chirascan (Applied Photophysics) в диапазоне длин волн 190–250 нм с шагом 1.0 нм и шириной полосы пропускания 1.0 нм. Образцы были подготовлены путем разбавления концентрированных стоковых растворов однодоменных антител в буфере с низким поглощением в дальнем УФ-диапазоне (5 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  рН 7.5, 100 мМ NaF). Конечная концентрация антител составляла 0.3–0.4 мг/мл и определялась спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм с использованием коэффициентов экстинкции, приведенных в таблице 5. Для измерений использовались разборные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0.5 мм компании International Crystal Laboratories. Каждый спектр был усреднен по десяти измерениям, математические методы сглаживания не применялись. Данные затем конвертировались в единицы средней  $\Delta\epsilon$  на

пептидную связь ( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ). Для деконволюции спектров кругового дихроизма, то есть количественного анализа содержания элементов вторичной структуры, использовался вычислительный метод “ $\beta$ -Structure Selection” [209], имплементированный на публичном веб-сервере *BeStSel* [210].

#### 2.4.2 Аналитическая гель-фильтрация

Анализ очищенных рекомбинантных однодоменных антител при помощи гель-фильтрации высокого разрешения проводился на хроматографе Acquity UPLC (Waters) с использованием колонки Superdex 75 Increase 10/300. Колонка была предварительно эквilibрирована фильтрованным и дегазированным буфером PBS pH 7.4 при скорости потока 0.5 мл/мин. Для калибровки производилась инъекция 100 мкл смеси пяти белков-стандартов LMW: апротинина (6.5 кДа), рибонуклеазы А (13.7 кДа), карбоангидразы (29 кДа), овальбумина (43 кДа) и кональбумина (75 кДа). Все образцы однодоменных антител были разбавлены до концентрации 0.5–0.9 мг/мл, и 100 мкл каждого образца инжесктировалось для анализа на предварительно эквilibрированной колонке. Хроматограммы представляют собой график сигнала поглощения на длине волны 280 нм в зависимости от времени после инъекции, переведенного в объем элюента. Молекулярные массы анализируемых белков были оценены из калибровочной кривой, построенной по белкам-стандартам LMW. Дополнительно для проб однодоменных антител для последующей кристаллизации была проведена препаративная гель-фильтрация по аналогичному протоколу на колонке Superdex 200pg для финальной очистки мономерного белка и смены буфера. В таком случае использовался буфер 20 мМ HEPES pH 7.5, 50 мМ NaCl.

#### 2.4.3 Определение дисульфидных связей методом Элмана

Количественное определение свободных тиольных групп в однодоменных антителах проводилось при помощи реакции с реагентом Элмана (дитионитробензойная кислота). В расчетах для уходящей в процессе реакции группы NTB (тионитрофильный анион) использовался молярный коэффициент экстинкции  $13\,700\ M^{-1}cm^{-1}$  при длине волны 412 нм. Растворы белков разводились в буфере для денатурации (50 мМ  $Na_2HPO_4$ - $NaH_2PO_4$  pH 7.4, 8 М мочевины, 1% SDS, 1 мМ EDTA) до конечной концентрации 50–100 мкМ. Затем добавлялся избыток реагента Элмана, и поглощение на 412 нм измерялось спектрофотометрически несколько раз в течение 30 минут. Из максимального полученного сигнала вычитался референсный сигнал реакции в идентичных условиях без белка. Затем полученное значение поглощения переводилось в единицы концентрации с использованием молярного коэффициента

экстинкции для NTV и делилось на концентрацию однодоменного антитела в реакционной смеси. Полученное число тиольных групп усреднялось по трем измерениям.

Для измерения количества дисульфидных связей применялся модифицированный метод Элмана с реагентом NTSB (2-нитро-5-тиосульфобензоат натрия) [211]. Денатурированный белок сначала восстанавливался при помощи реакции с избытком сульфита натрия, и затем общее число тиольных групп определялось посредством реакции с NTSB, которая дает ту же уходящую группу, что и реакция с реагентом Элмана. NTSB был синтезирован из реагента Элмана при помощи реакции с сульфитом натрия и кислородом как описано в оригинальной статье [211]. Растворы однодоменных антител разводились в свежеприготовленном буфере для денатурации и восстановления (0.1 М глицин-NaOH pH 9.4, 6 М гуанидин тиоцианат, 0.2 М Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 5 мМ EDTA), после чего добавлялся избыток NTSB и далее эксперименты проводились аналогично тому, как описано для теста Элмана.

#### **2.4.4 Анализ посттрансляционных модификаций при помощи масс-спектрометрии**

Стоковые растворы однодоменных антител были разбавлены до конечной концентрации 1–2 мг/мл и подвергнуты тщательному диализу против деионизованной воды milliQ. Диализ проводился в течение суток при комнатной температуре с тремя сменами воды для полного удаления остаточных солей в пробах. Для обеспечения ионизации к образцам была добавлена уксусная кислота (BCD090-P1) или муравьиная кислота (все остальные белки) в конечной концентрации 1%. Измерения масс-спектров проводились на квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре maXis Q-TOF (Bruker Daltonik) в режиме положительных ионов без фрагментации. Использовался прямой ввод образца при помощи шприцевого насоса и электроспрей ионизация. Масс-спектры для каждого образца были усреднены по времени в программе *DataAnalysis 4.0* (Bruker Daltonik) и экспортированы в виде текстовых файлов, содержащих величины отношений  $m/z$  и интенсивностей, полученных из измеренных ионных токов. Дальнейший анализ проводился в соответствии с методологией, разработанной Rhoads и соавторами, с использованием их программы в *Matlab* [212]. Была проведена деконволюция зарядовых состояний и получен масс-спектр, усредненный по серии пиков для различных зарядов. Затем для усредненного масс-спектра была проведена аппроксимация наблюдаемого экспериментального изотопного распределения различными брутто-формулами, определена средняя масса белка и среднеквадратичные ошибки аппроксимации для различных брутто-формул. Таким образом для каждого однодоменного антитела определены брутто-формулы, наиболее хорошо описывающие наблюдаемые изотопные распределения в измеренных масс-спектрах.



### 2.4.5 Получение кривых денатурации и анализ термодинамической стабильности

Для исследования кривых денатурации однодоменных антител были приготовлены серии растворов белков в 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> буфере pH 8.0 с различными концентрациями мочевины в диапазоне от 0 до 10 М с шагом 0.25 М. Для определения доли денатурированного белка изучались изменения собственной флуоресценции аминокислотных остатков триптофана в исследуемых антителах. Спектр триптофановой флуоресценции чувствителен к структурным изменениям в белке и сдвигается в длинноволновую область, меняет форму и интенсивность при денатурации, что было использовано для расчета долей нативного и денатурированного антитела. Измерения флуоресценции проводились на спектрометре Chirascan (Applied Photophysics) в спектральном диапазоне 300–500 нм с шагом 1.0 нм при возбуждении светом с длиной волны 280 нм. Для каждого спектра флуоресценции рассчитан коэффициент асимметрии  $S$  распределения интенсивности. Затем кривая денатурации каждого белка была построена как зависимость  $S$  от концентрации мочевины. Для определения коэффициента  $m$  и концентрации мочевины при половинной денатурации  $Urea_{1/2}$ , кривая денатурации была аппроксимирована следующей сигмоидой:

$$S = \frac{S_F + S_U \cdot \exp\left(\frac{-m \cdot (Urea_{1/2} - Urea)}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-m \cdot (Urea_{1/2} - Urea)}{RT}\right)}$$

где  $S_F$  и  $S_U$  — величины  $S$  для нативного и денатурированного состояний, соответственно,  $R$  — универсальная газовая постоянная, 8.3 Дж·моль<sup>-1</sup>·К<sup>-1</sup>,  $T$  — температура в кельвинах, а коэффициент  $m$  описывает зависимость свободной энергии денатурации от концентрации мочевины,  $\Delta G(Urea, T) = m \cdot (Urea_{1/2}(T) - Urea)$ . Для анализа данных был разработан скрипт на языке *Python* с использованием функций библиотеки *NumPy*. Аппроксимация кривых денатурации проводилась нелинейным методом наименьших квадратов. Таким образом были измерены спектры флуоресценции и затем построены и проанализированы кривые денатурации для серий образцов каждого однодоменного антитела с различными концентрациями мочевины. Каждая серия образцов исследовалась при различных температурах в диапазоне 10–65 °С с шагом 5 °С. При каждой температуре образцы инкубировались в течение по крайней мере двух часов для достижения термодинамического равновесия. После аппроксимации всех кривых денатурации и нахождения значений  $m$  и  $Urea_{1/2}(T)$  при различных температурах, для каждого однодоменного антитела рассчитаны значения свободной энергии денатурации  $\Delta G(T)$  во всем изученном диапазоне температур.

## 2.5 Макромолекулярная кристаллография и моделирование

### 2.5.1 Поиск и оптимизация условий кристаллизации

Для идентификации условий кристаллизации однодоменного антитела BCD090-M2 был проведен скрининг методом разреженных матриц с использованием наборов реагентов Classics I и II, AmSO4 (Qiagen), Clear Strategy I и II, а также Morpheus (Molecular Dimensions). Эксперименты по кристаллизации проводились методом диффузии паров в 96-луночных планшетах с сидящей каплей при температуре 19 °С. Каждая кристаллизационная капля состояла из 100 нл раствора белка с концентрацией 17 мг/мл в буфере 20 мМ HEPES pH 7.5, 50 мМ NaCl после препаративной гель-фильтрации и 100 нл кристаллизационного раствора из соответствующей лунки набора. Скрининг выявил два класса перспективных условий кристаллизации. Первый класс условий содержал соли карбоновых кислот и полиэтиленгликоль в качестве осадителя (набор Morpheus, условия № 73 и № 76), второй класс условий содержал дивалентные катионы и также полиэтиленгликоль (например, набор Classics II, условие № 64). Кристаллизация BCD090-M2 с найденными условиями была воспроизведена в 24-луночных планшетах с использованием метода висящей капли. Объем капли составлял 2 мкл, соотношение раствора белка и кристаллизационного раствора было 1:1, объем раствора осадителя составлял 0.5 мл, и кристаллизация проводилась в течение одной недели в инкубаторе при 20 °С.

В случае первого условия кристаллизации (Morpheus, № 73) кристаллы белка правильной формы размером 0.2–0.3 мм формировались через 3–4 дня. Предварительный анализ показал дифракцию вплоть до разрешения 1.6 Å, в связи с чем дополнительной оптимизации условий кристаллизации не проводилось. В дальнейшем кристаллы для съемки рентгеновских данных растились с использованием первоначально идентифицированного кристаллизационного раствора. В случае второго условия кристаллизации (Classics II, № 64) проводилась оптимизация состава кристаллизационного раствора для увеличения размера кристаллов и улучшения их морфологии. Оказалось, что из дивалентных катионов только  $\text{Cd}^{2+}$  необходим для кристаллизации. Оптимизированный по составу, pH и концентрациям  $\text{Cd}^{2+}$  и полиэтиленгликоля кристаллизационный раствор имел следующий состав: 0.1 М MES pH 6.5, 12% PEG 3350, 5 мМ  $\text{CdSO}_4$ . В результате оптимизации удалось воспроизводимо выращивать кристаллы размером до 0.7 мм, которые обычно появлялись через 4–5 дней и дифрагировали не хуже 2.0 Å.

### 2.5.2 Съемка и обработка рентгеновских данных

Для съемки рентгеновских данных использовались два метода установки кристаллов, классический метод съемки рентгеновских данных при комнатной температуре с установленным

в запаянный капилляр кристаллом и современный метод съемки в криогенных условиях, когда кристалл замораживается в специальной полимерной микроскопической петле. Кристаллы, выращенные в первых условиях (Morpheus, № 73), после вскрытия лунки ненадолго помещались в кристаллизационный раствор с добавлением 25% глицерина для криопротекции, и затем подвергались шоковой заморозке в потоке холодного азота. Съемка данных проводилась с использованием криогенной установки Cobra II (Oxford Instruments) в потоке азота температурой 100 К. Кристаллы, выращенные с ионами  $\text{Cd}^{2+}$ , деградировали при шоковой заморозке и были смонтированы в тонкостенные кварцевые капилляры (Hampton Research) для измерений при комнатной температуре.

Все дифракционные данные были сняты на приборе Карра Apex II (Bruker AXS), оснащенном четырехкружным  $\kappa$ -гонометром и двумерным CCD детектором. В качестве источника рентгеновского излучения использовалась микрофокусная рентгеновская трубка  $\text{I}\mu\text{S 2.0}$  (Incoatec) с медным анодом и длиной волны излучения  $\text{CuK}\alpha$  1.5418 Å. Оптимальные стратегии съемки данных были определены в программе *Apex 2*. После получения набора двумерных дифракционных картин, данные были интегрированы в программе *SAINTE* для определения интенсивности рентгеновских рефлексов и затем нормированы в программе *SADABS*. Выращенный в первых условиях кристалл имел высококачественную дифракцию вплоть до разрешения 1.6 Å. Параметры элементарной ячейки были определены в программе *XPREF*, что дало для первого кристалла следующие значения:  $a=65.76$  Å,  $b=38.93$  Å,  $c=47.48$  Å,  $\alpha=\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=102.24^\circ$ , моноклинная сингония, пространственная группа C2 (группа № 5). Кристалл с  $\text{Cd}^{2+}$  имел дифракцию вплоть до 1.9 Å и триклинную структуру со следующими параметрами элементарной ячейки:  $a=35.77$  Å,  $b=41.53$  Å,  $c=46.49$  Å,  $\alpha=89.99^\circ$ ,  $\beta=67.92^\circ$ ,  $\gamma=76.06^\circ$ , пространственная группа P1 (группа № 1). При этом в данном кристалле в каждой элементарной ячейке находились две различные молекулы BCD090-M2, не связанные кристаллографической симметрией.

### 2.5.3 Молекулярное моделирование комплексов антител с рецептором ErbB3

Для моделирования структур комплексов внеклеточного домена рецептора ErbB3 с однодоменными антителами использовалась модель машинного обучения *AlphaFold 2* [213]. Для решения данной задачи применялась специализированная разновидность данной модели, называемая *AlphaFold Multimer*, прошедшая тренировку для определения структур мультимерных белковых комплексов с заданной стехиометрией [214]. Расчеты производились на публичных серверах Google Colab с использованием недавно разработанной платформы *ColabFold* [215], обеспечивающей удобный доступ к инструментам *AlphaFold*. Для

моделирования использовались последовательности белков, приведенные в таблице 4. При моделировании были заданы следующие основные параметры: стехиометрия 1:1, тип модели *alphafold2\_multimer\_v3*, *num\_seeds = 16*. Для сравнения гомологии различных структур проводилось структурное выравнивание по C<sup>α</sup> атомам и расчет их среднеквадратичного отклонения (RMSD) в пакете *PyMol*. Визуализация всех структур белков в данной работе, включая иллюстрации в Главе 1, проводилась в *PyMol* либо *Illustrate* [216].

## 2.6 Исследования связывания однодоменных антител с рецептором

### 2.6.1 Изучение кинетики и аффинности связывания однодоменных антител с рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса

Все эксперименты по исследованию взаимодействия белков методом поверхностного плазмонного резонанса были проведены на приборе Biacore T200 (GE Healthcare). Эксперименты проводились при 37 °С с использованием чипов CM5. Для иммобилизации через аминокислотные группы в белках, эктодомен ErbB3 или ECD<sup>III</sup> растворялись в 10 мМ ацетатном буфере pH 4.5 в концентрации 10–50 мкг/мл и наносились на поверхность чипа, предварительно активированную при помощи смеси реагентов EDC и NHS. Типичные уровни иммобилизации составляли 3 000 RU для ECD<sup>III</sup> и 5 000–11 000 RU для ECD. Концентрации растворов антител измерялись спектрофотометрически по поглощению на 280 нм, после чего готовились их серийные разведения в буфере HBS (10 мМ HEPES pH 7.4, 150 мМ NaCl) с добавлением 50 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина для подавления неспецифического связывания. Все растворы фильтровались через 0.22 мкм мембраны и дегазировались перед экспериментами. Во всех измерениях в качестве рабочего буфера использовался HBS и поток составлял 10 мкл/мин, чего было достаточно для подавления эффектов массопереноса вблизи поверхности чипа.

Длительности фазы ассоциации и диссоциации во всех измерениях были 30 минут. Такие продолжительные фазы использовались, во-первых, для того, чтобы достигнуть равновесия при связывании, а также эффективно элюировать антитела с рецептора без обработки чипа агрессивными буферами для регенерации. Таким образом удалось избежать постепенной деградации рецептора в длинных сериях измерений и исследовать связывание в идентичных условиях. Анализ сенсограмм выполнялся в программе *Biacore Evaluation* (GE Healthcare). Из измеренных сенсограмм вычитался сигнал референсной дорожки чипа без рецептора и сигнал связывания от буфера без антитела. Равновесный сигнал связывания для каждой концентрации образца определялся за 5 секунд до окончания фазы связывания. Полученные значения экспортировались в виде текстовых данных, после чего зависимость сигнала *R* от концентрации

антитела  $Ab$  аппроксимировалась уравнением Хилла при помощи нелинейного метода наименьших квадратов:

$$R = R_0 + R_{max} \cdot \frac{Ab^n}{K_D + Ab^n}$$

где  $R_0$  и  $R_{max}$  обозначают минимальный и максимальный отклик в единицах RU,  $K_D$  обозначает равновесную константу диссоциации, а  $n$  обозначает коэффициент Хилла, который в случае простого связывания 1 к 1 равен единице. Кинетические константы  $k_a$  и  $k_d$  получены путем глобальной аппроксимации сенсограмм в модели связывания 1:1 в программе *Biacore Evaluation* для трех разных концентраций вблизи  $K_D$ . Все приведенные в работе значения являются геометрическими средними для двух независимых экспериментов.

### 2.6.2 Эпитопное картирование и изучение конкуренции с лигандом

Для эпитопного картирования и исследования конкуренции однодоменных антител с лигандом были проведены эксперименты по связыванию с иммобилизированным рецептором *in tandem* [217]. Первое антитело или лиганд инжестировалось на чип в течение 10 минут для достижения насыщения связывания с рецептором, после чего незамедлительно следовала инъекция смеси двух однодоменных антител либо антитела и лиганда. Концентрации антител и лиганда были высокими относительно равновесных констант диссоциации  $K_D$  для обеспечения насыщения большинства сайтов связывания. Так, для BCD090-P1 и BCD090-M2 использовались растворы с концентрацией 0.5 мкМ, для BCD090-M456 — 16 мкМ, а для херегулина  $\beta$ 1 концентрация была 0.1 мкМ. Все эксперименты повторялись с различным порядком инъекции пар исследуемых белков.

### 2.6.3 Флуоресцентная конфокальная микроскопия

Однодоменные антитела и трастузумаб конъюгированы с флуоресцентными метками sulfo-Cy5 и AF488 в соответствии со стандартным протоколом [218]. В растворы белков в буфере 0.1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 8.2 добавлялся 10–20-кратный молярный избыток активированного NHS-эфира флуоресцентного красителя, после чего реакционные смеси инкубировались в темноте в течение 2-х часов при температуре 4 °С. Непрореагировавший краситель удалялся при помощи хроматографии на колонке Sephadex G25, предварительно эквилибрированной буфером PBS. Эффективность конъюгации оценивалась спектрофотометрически по поглощению на 280 нм и 646 нм (Cy5), либо 495 нм (AF488).

За два дня до клеточного эксперимента,  $2 \cdot 10^5$  клеток рассеивались в чашки Петри со стерильными покровными стеклами. Эксперименты проводились на клеточных линиях

аденокарциномы молочной железы MCF-7, BT-474 и SK-BR-3, гепатоцеллюлярной аденокарциномы Hep G2 и хронического миелоидного лейкоза K562. В случае линии K562, клетки были перенесены на стекла уже после окрашивания. После двухдневной инкубации при стандартных условиях роста стекла с клетками были дважды промыты буфером PBS и окрашены буфером с добавлением 5 мкг/мл флуоресцентно меченых антител и красителя Hoechst 33342. После окрашивания стекла были промыты PBS и монтированы в конфокальный микроскоп AxioObserver Z1 (Carl Zeiss). Микроскопия проводилась с использованием 63x иммерсионного объектива Plan-Apochromat (Carl Zeiss) и возбуждения флуоресценции лазерами с длиной волны 488 нм и 639 нм. Полученные для разных оптических каналов снимки были совмещены для исследования пространственной ко-локализации антител.

## **2.7 Изучение антипролиферативной активности однодоменных антител**

### **2.7.1 Тесты на антипролиферативную активность**

Для исследования антипролиферативной активности однодоменных антител использовались клеточные линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, а также линия HeLa в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировались в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина в инкубаторе при температуре 37 °C с увлажненным воздухом и 5% CO<sub>2</sub>. За две недели до проведения тестов на пролиферацию клетки переводились на среду DMEM без фенолового красного. Помимо этого, обычная фетальная сыворотка в среде заменялась на обработанную при помощи активированного угля, предварительно инкубированного в растворе 5% декстрана для уменьшения нежелательной сорбции белков [219].

Для проведения теста клетки росли до конfluenceности 50–70%, снимались при помощи раствора трипсина и EDTA, отмывались от ростовой среды и перерастворялись в тестовой среде. Для клеток MCF-7 использовалась среда DMEM без фенолового красного с добавлением 0.3% обработанной активированным углем FBS, в случае SK-BR-3 концентрация сыворотки была 10%. В обоих случаях в тестовую среду добавлялся рекомбинантный херегулин  $\beta$ 1 до конечной концентрации 50 нг/мл. Клеточная суспензия с не менее чем 90% живых клеток доводилась до необходимой концентрации и переносилась в лунки 96-луночного плоскодонного планшета из расчета 5 000 клеток на лунку. В течение суток после переноса происходило кондиционирование среды. На следующий день в лунки добавлялись стерильные растворы однодоменных антител, полученные серийными разведениями в тестовой среде. В качестве отрицательных контролей использовались среда без добавления однодоменного антитела, терапевтическое антитело ритуксимаб против CD20, не взаимодействующее с рецепторами HER2 и ErbB3, а также клетки

HeLa, не экспрессирующие рецепторы HER2 и ErbB3. Все измерения проводились в трех повторениях. Культуральные планшеты инкубировались в течение 5 дней при температуре 37 °C с увлажненным воздухом и 5% CO<sub>2</sub>. Пролиферация клеток оценивалась при помощи метаболического красителя MTS. После добавления красителя и инкубации при 37 °C в течение часа, величина поглощения на длине волны 495 нм в каждой лунке измерялась при помощи планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Scientific). Полученные экспериментальные кривые подавления пролиферации усреднялись по трем независимым биологическим экспериментам. Эффективные концентрации  $EC_{50}$  были получены аппроксимацией экспериментальных данных уравнением Хилла.

### 2.7.2 Проточная цитофлуориметрия

Оценка выживаемости клеток после обработки различными концентрациями однодоменных антител также проводилась по данным проточной цитофлуориметрии. Для каждого эксперимента 25 000 клеток SK-BR-3, выращенных как описано выше для антипролиферативных тестов с MTS, рассеивались в лунки 24-луночного планшета в тестовой среде. Через сутки к клеткам добавлялась эквимольная смесь однодоменных антител BCD090-P1 и BCD090-M2 в конечной концентрации 0.05, 1.0 и 50 мкг/мл. Анализ выживаемости проводился на четвертый и седьмой дни инкубации с антителами. Клетки снимались раствором 0.25% трипсина и 2 мМ EDTA и окрашивались иодистым пропидием. Анализ клеточных популяций проводился на проточном цитофлуориметре FACSCanto (BD). Приведенные данные являются средними значениями по трем повторам, вариация показана на графиках как  $\pm$  одно стандартное отклонение (SD). Статистическая значимость различий в выживаемости клеток между разными условиями была оценена при помощи *t*-теста.

---

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Совершенствование технологий отбора антител

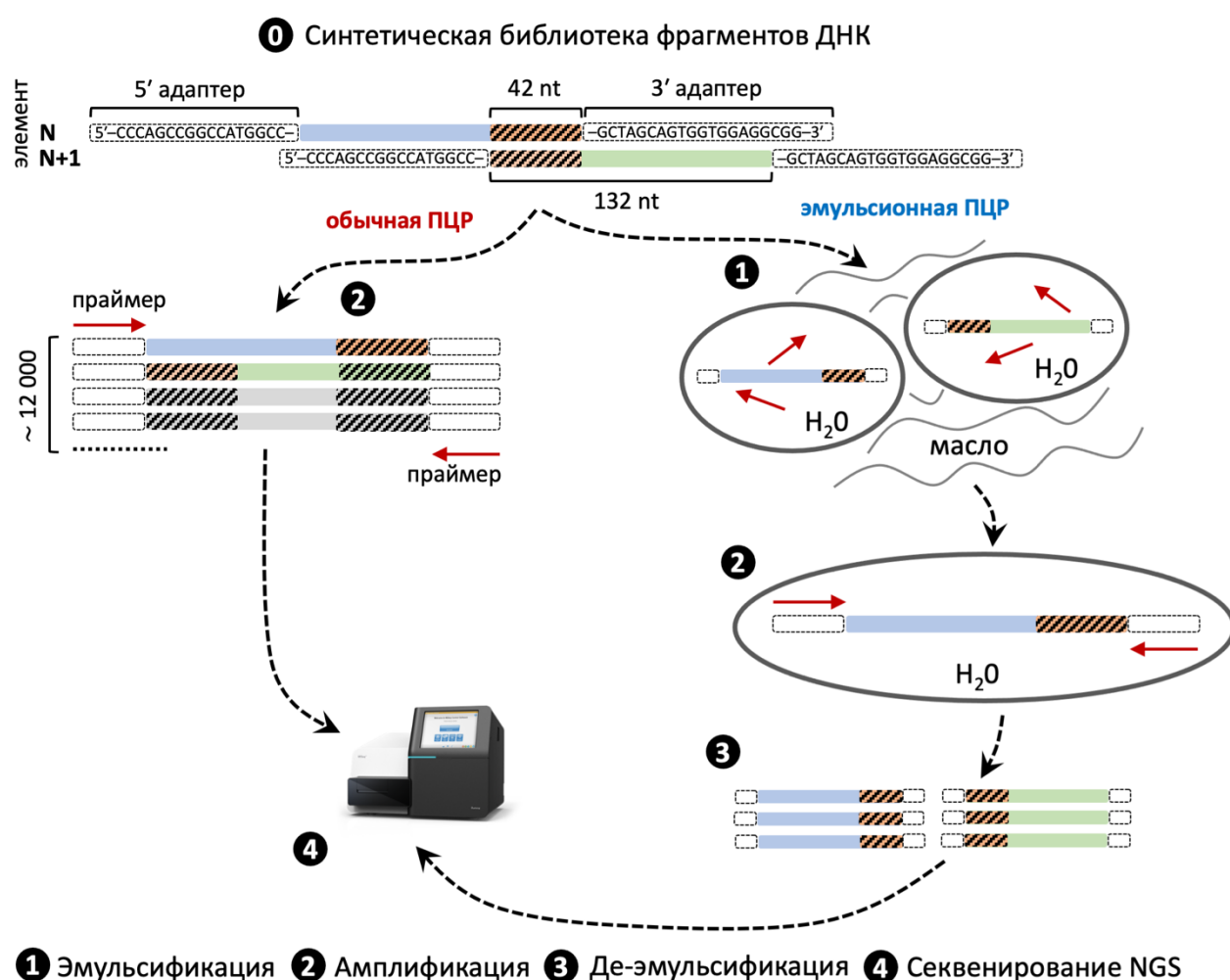
#### 3.1.1 Изучение ошибок и изменения клонального разнообразия при амплификации сложных библиотек ДНК

Современные технологии отбора антител основаны на использовании библиотек ДНК, что обуславливает необходимость разработки эффективных методов их дизайна, амплификации и дисплея. При этом библиотеки генов иммуноглобулинов характеризуются огромным клональным разнообразием, часто превышающим  $10^9$  различных вариантов, из которого необходимо отобрать единственную молекулу с уникальными функциональными характеристиками. В связи с этим требуется создание более совершенных методов молекулярной иммунологии, позволяющих оперировать сложными библиотеками ДНК с сохранением разнообразия их репертуаров. В данной работе исследуются проблемы повышения эффективности амплификации и сохранения клонального разнообразия сложных библиотек ДНК при проведении полимеразной цепной реакции.

Полимеразная цепная реакция является центральным методом молекулярной биологии. Как проиллюстрировано на рисунке 5, отбор антител при помощи фагового дисплея не обходится без по крайней мере двух этапов ПЦР амплификации. Именно на этих этапах возможно накопление ошибок и деградация клонального разнообразия. Часть ошибок может быть связана с работой самой полимеразы, но это не является основной проблемой, поскольку современные высокоточные полимеразы с 3'-5' корректирующей экзонуклеазной активностью обладают низкой частотой ошибок. Например, примененная в данной работе полимеразы Q5 допускает ошибку с вероятностью всего  $5.3 \cdot 10^{-7}$  на один нуклеотид [220]. Помимо этого, ошибки ДНК полимераз в основном представляют собой точечные замены, и практически никогда инсерции и делеции, что делает маловероятным сбой рамки считывания и, соответственно, потерю определенного клона. Гораздо более глубокой проблемой является рекомбинация гомологичных фрагментов ДНК при амплификации, приводящая к образованию побочных химерных продуктов [221]. Данный процесс ведет к катастрофическому снижению эффективности амплификации и деградации репертуара сложных ДНК библиотек. Проблема рекомбинации при ПЦР не может быть решена созданием улучшенной полимеразы и является фундаментальным свойством амплификации больших ансамблей молекул, имеющих гомологичные участки. Указанная проблема особенно сильно проявляется при отборе антител, т. к. кодирующие фрагменты неминуемо имеют гомологичные участки в каркасной области.



Инкапсуляция фрагментов ДНК в капли эмульсии и их амплификация отдельно друг от друга в так называемой эмульсионной ПЦР (ePCR) решают проблему нежелательной рекомбинации [185; 221]. Данная технология была ранее применена в иммунологии для отбора редких клонов высокоаффинных антител [186] и для секвенирования антител из одиночных В-клеток с корректным спариванием тяжелых и легких цепей [222]. Однако до сих пор не было проведено детальных исследований процесса амплификации в эмульсионной ПЦР и факторов, влияющих на ее эффективность. В настоящем исследовании впервые проведен детальный анализ ошибок в обычной и эмульсионной ПЦР при помощи секвенирования следующего поколения (NGS) и построена теоретическая модель амплификации в ePCR, предсказывающая ее эффективность. Принципиальная схема экспериментов приведена на рисунке 8.

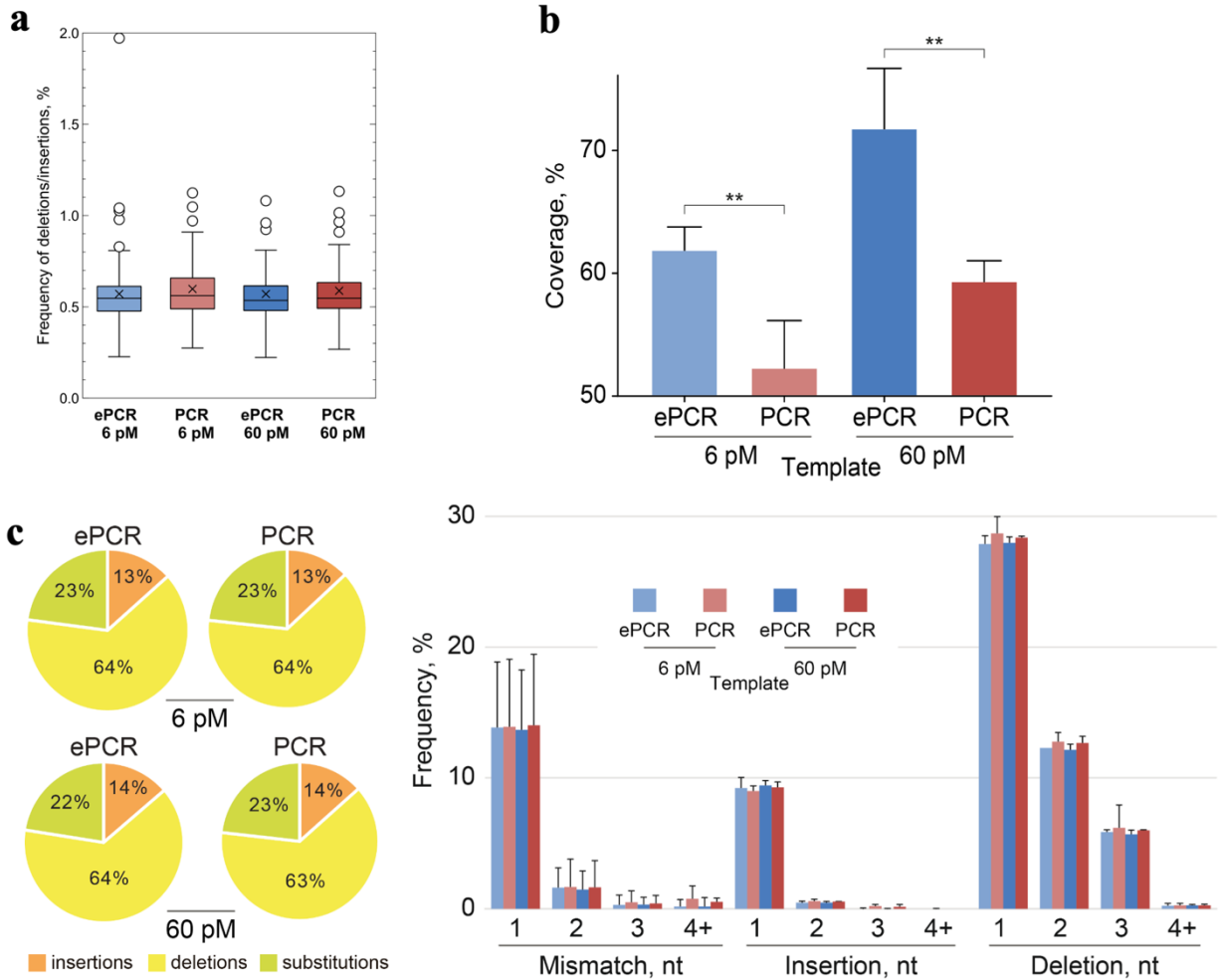


**Рисунок 8** — Схема экспериментов по амплификации ДНК библиотеки. Библиотека содержала ~12 000 элементов, имеющих одинаковые адаптеры и гомологичные участки в соседних элементах. Амплифицированная при помощи обычной (этап 2) или эмульсионной ПЦР (этапы 1–3) библиотека затем анализировалась при помощи секвенирования следующего поколения (этап 4).

Для исследования процессов амплификации изучалась синтетическая библиотека, дизайн которой приведен на рисунке 8. Каждый из примерно 12 000 одноцепочечных фрагментов ДНК в составе библиотеки имел общие 5' и 3' адаптеры, универсальные праймеры к которым использовались при амплификации. Центральный участок каждого фрагмента ДНК в библиотеке был уникальным, при этом соседние элементы библиотеки с номерами  $N$  и  $N+1$  имели гомологичные участки длиной 42 нуклеотида. Таким образом, фрагмент ДНК в библиотеке имел достаточно длинное перекрытие с двумя другими фрагментами, предшествующим и последующим. Наличие гомологичных участков делало исследуемую библиотеку особенно сложной для амплификации, тем самым моделируя проблемы, возникающие при работе с библиотеками в иммунологии. Поскольку библиотека была полностью синтетической, каждый фрагмент обладал уникальным номером и заранее известной заданной последовательностью. Впоследствии статистика возникновения ошибок была изучена путем сравнения данных секвенирования и исходных заданных последовательностей.

Амплификация библиотеки осуществлялась при помощи полимеразы Q5 при стандартных условиях. В случае эмульсионной ПЦР, реакционные смеси предварительно инкапсулировались в капли эмульсии воды в минеральном масле с добавлением сурфактанта при помощи вортексирования [223]. Реакции обычной и эмульсионной ПЦР проведены в идентичных условиях при нескольких различных концентрациях библиотеки. Затем пробы амплифицированной разными способами библиотеки изучались количественно при помощи секвенирования следующего поколения. В результате секвенирования был получен массив прочтений (ридов), соответствующих элементам библиотек. Глубина секвенирования, т. е. среднее количество прочтений на один элемент библиотеки, варьировалась в диапазоне 10–20 в зависимости от образца. Далее изучались частоты ошибок различных типов в полученных прочтениях и покрытие библиотеки, то есть доля ее элементов, имеющих хотя бы одно прочтение без делеций и инсерций.

На рисунке 9а представлен статистический анализ усредненных по прочтениям распределений вероятностей делеций и инсерций для всех позиций во фрагментах ДНК для изученной библиотеки. Анализ проведен для двух различных концентраций библиотеки, и двух методов амплификации, обычной и эмульсионной ПЦР. Как видно из графиков, в целом библиотека характеризуется достаточно высокими вероятностями делеций и инсерций, в среднем около 0.5% в каждой позиции. При этом вероятности делеций и инсерций не зависят от концентрации и слабо зависят от способа амплификации.



**Рисунок 9** — Анализ различных типов ошибок и покрытия библиотеки по данным NGS. **(а)** Вероятности делеций и инсерций в расчете на один нуклеотид, амплификация обычной (PCR) и эмульсионной ПЦР (ePCR). Показана медиана, 1 и 3 квартили, усы соответствуют полутора межквартильным расстояниям, крестами обозначены средние значения. **(б)** Покрытие библиотеки, то есть количество элементов с  $>0$  прочтений без делеций и инсерций. Эмульсионная ПЦР статистически значимо увеличивает покрытие,  $p < 0.01$  ( $t$ -тест), показаны средние значения, усы обозначают стандартное отклонение. **(с)** Распределение ошибок по их типу. Преобладают одиночные делеции, на втором месте одиночные замены.

Эмульсионная ПЦР дает воспроизводимое, но относительно небольшое снижение вероятности делеций и инсерций. Данное наблюдение объясняется тем, что подавляющее большинство подсчитанных ошибок являются делециями, которые появились в библиотеке на этапе химического синтеза. Различия в точности обычной и эмульсионной ПЦР могут быть более практически значимы при работе с библиотеками природных последовательностей, где отсутствуют исходные делеции и инсерции в отличие от химически синтезированных фрагментов ДНК.

Гораздо большее различие между обычной и эмульсионной ПЦР проявляется в их влиянии на клональное разнообразие. На рисунке 9b представлен анализ покрытия библиотеки для амплификации различными методами при двух исходных концентрациях. Как видно из приведенных данных, амплификация в каплях эмульсии ведет к значительному (более 15%) и статистически значимому ( $p < 0.01$ ,  $t$ -тест) увеличению покрытия. Разница между обычной и эмульсионной ПЦР сохраняется при увеличении концентрации библиотеки. Данный результат может быть интерпретирован как свидетельство того, что эмульсификация действительно снижает вероятность рекомбинации и подавления ПЦР с образованием нежелательных побочных продуктов. Рекомбинация за счет гомологичных участков является наихудшим видом ошибки амплификации, поскольку ведет к полной потере продукта. В отличие от других типов ошибок, делеций, инсерций и замен, детальный анализ встречаемости которых приведен на рисунке 9с, напрямую проанализировать ошибки рекомбинации затруднительно, поскольку они не попадают в результаты секвенирования. Можно заключить, что амплификация при помощи эмульсионной ПЦР значительно лучше сохраняет клональное разнообразие сложной ДНК библиотеки по сравнению с обычной ПЦР.

### **3.1.2 Теоретическая модель эффективности амплификации библиотеки ДНК, инкапсулированной в капли эмульсии**

Для понимания фундаментальных закономерностей амплификации ДНК библиотек и количественного моделирования эффективности эмульсионной ПЦР в настоящей работе была впервые построена теория данного процесса. При построении модели эмульсионной ПЦР предполагалось, что капли эмульсии имеют одинаковый размер и молекулы ДНК распределены случайно между ними. В связи с этим использовалось стандартное для случайного распределения частиц допущение, что число молекул в каждой капле описывается распределением Пуассона. Для количественного анализа процесса рекомбинации и подавления ПЦР считалось, что наличие двух различных фрагментов ДНК в одной капле влечет полное подавление реакции и отсутствие продукта с фиксированной вероятностью, обозначенной  $P_m$ . Также были введены следующие параметры:

$M$  – общее количество молекул продуктов ПЦР,

$Y$  – эффективность ПЦР (“*Yield*”), отношение количества продуктов к имеющимся реагентам,

$C$  – общее количество капель эмульсии,

$C_n$  – количество капель с ровно  $n$  фрагментами ДНК из библиотеки,

$\lambda$  – среднее количество фрагментов ДНК в каплях,

$A_n$  – коэффициент амплификации, количество молекул продуктов ПЦР на один фрагмент ДНК.

Следующие формулы описывают распределение Пуассона фрагментов ДНК по каплям:

$$\frac{C_n}{C} = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}$$

$$\lambda = \sum_{n=0}^{\infty} n \cdot \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}$$

Для начала рассматривается амплификация одиночного фрагмента ДНК в капле, содержащей  $n$  фрагментов. Для расчета вероятности того, что конкретный фрагмент будет успешно амплифицирован, используется ранее введенный параметр  $P_m$ . Для определенного фрагмента существуют  $n - 1$  других молекул в капле, которые могут подавить его амплификацию, каждая с вероятностью  $P_m$ . Таким образом, вероятность успешной амплификации может быть рассчитана как произведение вероятностей  $n - 1$  независимых событий:

$$(1 - P_m)^{n-1}$$

Феномен подавления амплификации, математически описываемый через вероятность  $P_m$ , возникает из-за длинных гомологичных участков, делающих возможной нежелательную рекомбинацию при ПЦР. В исследуемых библиотеках А и В содержится около 12 000 фрагментов, которые имеют гомологичные участки длиной 42 нуклеотида в соседних элементах. Если два фрагмента с гомологичными участками попадают в одну каплю, предполагается, что их амплификация подавляется на всех последующих циклах ПЦР, из чего можно оценить значение  $P_m$  снизу как не менее  $1/6000$ . В реальности эта вероятность может быть еще больше.

После получения формулы для вероятности амплификации в капле, общее количество молекул продуктов ПЦР ( $M$ ) можно рассчитать путем суммирования по всем каплям с различным количеством фрагментов  $n$  и всем фрагментам в капле. Суммирование по всем фрагментам в капле вносит множитель  $n$ , что дает следующую формулу для  $M$ :

$$M = \sum_{n=0}^{\infty} A_n \cdot n \cdot C_n \cdot (1 - P_m)^{n-1}$$

Использование распределения Пуассона для  $C_n$  дает:

$$M = C \cdot \sum_{n=0}^{\infty} A_n \cdot n \cdot \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda} \cdot (1 - P_m)^{n-1}$$

Данное выражение описывает общий случай амплификации ДНК в каплях. Для его практического применения необходимо знать коэффициенты амплификации  $A_n$ , чтобы провести

суммирование и получить финальную формулу. Были рассмотрены два предельных случая, экспоненциальная ПЦР амплификация и область плато, для которых характерны различные  $A_n$ .

### Экспоненциальная амплификация

Если амплификация идет экспоненциально и реагенты не являются лимитирующим фактором, коэффициент амплификации не будет зависеть от  $n$ :

$$A_n = A = const$$

Произведение  $AC$  является константой, описывающей максимальное возможное суммарное количество молекул продукта во всех каплях. Суммирование для расчета  $M$  и деление на константу  $AC$  дает следующую формулу для эффективности амплификации  $Y$ :

$$Y = e^{-\lambda} \frac{1}{1 - P_m} \sum_{n=0}^{\infty} n \cdot \frac{\lambda^n}{n!} \cdot (1 - P_m)^n = \lambda \cdot e^{-P_m \lambda}$$

Как видно из выражения, эффективность является немонотонной функцией  $\lambda$ . Сначала наблюдается ее линейный рост при малом количестве фрагментов ДНК на каплю, который затем сменяется экспоненциальным снижением эффективности при больших  $\lambda$ . Для определения оптимального  $\lambda$ , при котором эффективность максимальна, можно продифференцировать выражение и найти точку с нулевой производной:

$$\lambda_{max} = \frac{1}{P_m}$$

При росте вероятности подавления ПЦР  $P_m$  оптимальное количество фрагментов ДНК на каплю стремится к единице.

### Плато

В отличие от рассмотренного выше случая экспоненциальной амплификации, при стандартных экспериментальных условиях, использованных в данной работе (35 циклов), амплификация достигает плато в большинстве капель. В случае плато, то есть режима реакции, в котором амплификация лимитирована истощением реагентов, предполагается, что все фрагменты ДНК в отсутствие рекомбинации амплифицируются одинаково, что дает следующее выражение для  $A_n$ :

$$A_n = \frac{A}{n}$$

Суммирование с  $n = 1$  дает следующий результат для эффективности амплификации:

$$Y = e^{-\lambda} \frac{1}{1 - P_m} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\lambda^n}{n!} \cdot (1 - P_m)^n = e^{-\lambda} \frac{1}{1 - P_m} \cdot (e^{\lambda(1 - P_m)} - 1) = \frac{1}{1 - P_m} \cdot (e^{-P_m \lambda} - e^{-\lambda}) \quad (\Phi 1)$$

В данном случае эффективность амплификации имеет весьма сложную зависимость от  $P_m$  и  $\lambda$ . В отсутствие эффекта подавления ПЦР, когда  $P_m = 0$ , эффективность растет монотонно с  $\lambda$  и приближается к единице:

$$Y_{P_m=0} = 1 - e^{-\lambda}$$

Напротив, когда вероятность подавления реакции  $P_m$  близка к единице, уравнение для  $Y(\lambda)$  может быть получено введением параметра  $\varepsilon$ :  $P_m = 1 - \varepsilon$  и разложением в ряд Тейлора при  $\varepsilon = 0$ :

$$Y_{P_m \rightarrow 1} = \lambda \cdot e^{-\lambda}$$

Как видно из полученного выражения, при больших  $P_m$  результат совпадает с формулой для экспоненциальной амплификации, то есть подавление амплификации доминирует над истощением реагентов и лимитирует количество продукта. Значение оптимального параметра  $\lambda$  может быть найдено из условия нулевой производной:

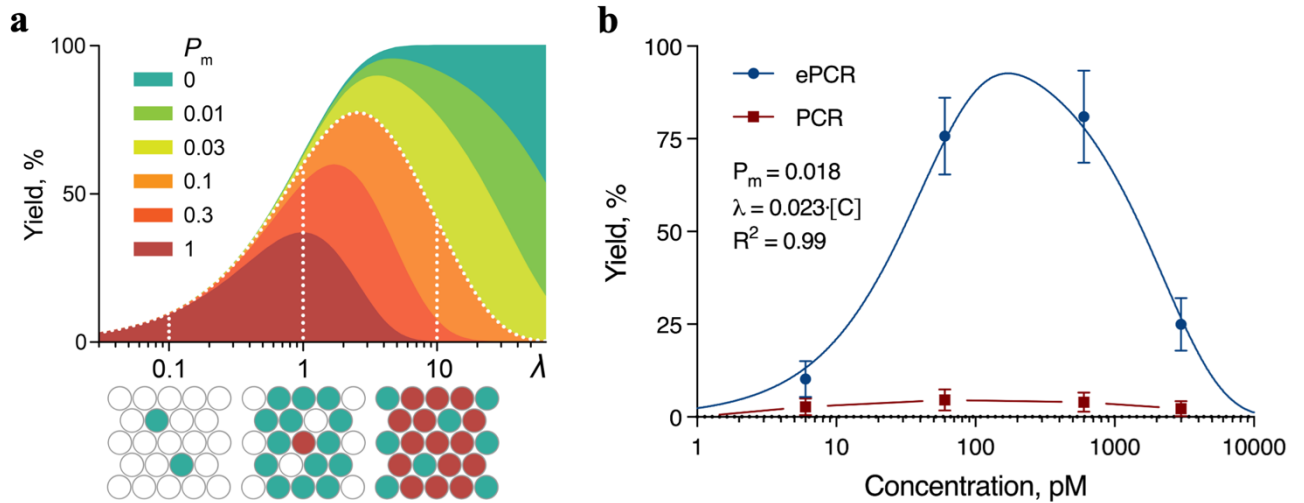
$$\lambda_{max} = \frac{1}{1 - P_m} \cdot \ln \frac{1}{P_m}$$

Данная формула дает предел  $\lambda_{max} = 1$  при  $P_m = 1$ . В отличие от случая экспоненциальной амплификации, снижение вероятности  $P_m$  ведет к очень медленному росту оптимального параметра  $\lambda$ . Таким образом, в режимах амплификации библиотек, когда реакция выходит на плато, оптимальной являются упаковка 1–10 молекул ДНК на каждую каплю, в зависимости от сложности библиотеки и ожидаемой вероятности  $P_m$ .

### Сравнение теории с экспериментальными данными

Разработанная теория амплификации ДНК библиотек в каплях эмульсии требует сравнения с экспериментальными данными. Для этого количество продукта ПЦР было измерено при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием, сканированием и анализом изображений. Сравнивались обычная и эмульсионная ПЦР, эксперимент проводился при различных концентрациях библиотеки.

На рисунке 10а приведены предсказания эффективности ПЦР амплификации для различного заполнения капель  $\lambda$  и нескольких значений вероятности подавления реакции  $P_m$ , вычисленные по формуле (Ф1). Из графиков видно, что при малом заполнении капель эффективность амплификации достаточно мала из-за множества пустых капель и соответственно неэффективного расходования реагентов в ПЦР. Затем существует область оптимальных значений  $\lambda$  от 1 до 10, где достигается пик эффективности амплификации. При дальнейшем увеличении среднего числа фрагментов ДНК в капле происходит падение эффективности из-за рекомбинации гомологичных участков. При этом рост вероятности подавления реакции  $P_m$  влияет как на оптимальную плотность упаковки, так и на общую эффективность ПЦР.



**Рисунок 10** — Теоретическая модель эффективности амплификации библиотек при помощи эмульсионной ПЦР. **(a)** Теоретическая зависимость эффективности амплификации в эмульсионной ПЦР от количества фрагментов ДНК на одну каплю ( $\lambda$ ) для разных вероятностей подавления реакции  $P_m$ . **(b)** Экспериментально полученные данные для амплификации библиотеки при помощи обычной (PCR) и эмульсионной ПЦР (ePCR) и их аппроксимация при помощи разработанной теории. Панель (a) приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [223] с изменениями.

На рисунке 10b приведены экспериментальные данные и их аппроксимация при помощи формулы (Ф1). Как видно из приведенного графика, теория замечательно описывает наблюдаемые экспериментальные значения ( $R^2=0.99$ ). При этом эмульсионная ПЦР обладает значительно большей, вплоть до 20-кратной, эффективностью амплификации по сравнению с обычной ПЦР. Теория хорошо описывает как изначальный рост эффективности ПЦР с увеличением концентрации библиотеки, так и последующий резкий эффект аутоингибирования при дальнейшем увеличении плотности упаковки капель эмульсии. В результате аппроксимации найден коэффициент пропорциональности между концентрацией библиотеки и средним числом молекул в каплях эмульсии  $\lambda$ . В соответствии с аппроксимацией, пик эффективности амплификации приходится на 110 пМ, что соответствует упаковке примерно 2 фрагментов ДНК в среднем в каждую каплю. Можно заключить что представленная теория помогает лучше понять процессы, происходящие при амплификации сложных ДНК библиотек и оптимизировать их для достижения большей эффективности и сохранения клонального разнообразия.



### 3.2 Разработка системы гетерологической экспрессии однодоменных антител

#### 3.2.1 Экспрессия в бактериях *E. coli* $\Delta$ *trxV* *Agor* cDsbC в виде химеры с белком SUMO позволяет получать растворимые фолдированные однодоменные антитела без молекулярных тагов

В рамках настоящего исследования были изучены новые однодоменные антитела к рецептору ErbB3 для блокирования его активации в опухолевых клетках. Иммунизация животных и фаговый дисплей антител проводились в биотехнологической компании «Биокад» в рамках проекта по разработке новых подходов к терапии HER2<sup>+</sup> рака молочной железы. Для первичной иммунизации двух лам использовался рекомбинантный эктодомен ErbB3 (ECD). Бустерная иммунизация проводилась субдоменом III (ECD<sup>III</sup>) для увеличения титра антител, специфичных к данному участку рецептора. Оба белка были получены в клетках CHO как описано в Главе 2. Субдомен III рассматривался как наиболее перспективный эпитоп, поскольку антитела к нему могут не только конкурировать с лигандом, но и аллостерически блокировать конформационные изменения ErbB3. Более того, из пяти анти-ErbB3 антител с расшифрованными кристаллическими структурами, три молекулы (зенокутузумаб, CDX-3379 и ISU104) связываются именно с субдоменом III. В результате фагового дисплея с селекцией по связыванию с ECD и последующего секвенирования фагов были отобраны три наиболее перспективных клона, названные **VCD090-P1**, **VCD090-M2** и **VCD090-M456**. Дальнейшие исследования были сфокусированы именно на этих трех антителах.

Как было показано в Главе 1 на основе обзора литературных данных, однодоменные антитела с разным успехом экспрессируются практически во всех типах лабораторных организмов, от кишечной палочки до зерен риса. При этом потенциально наиболее эффективной биотехнологией является их синтез в цитоплазме генетически модифицированных штаммов бактерии *E. coli*. В рамках данного исследования разработана технология получения однодоменных антител в бактериях *E. coli* *SHuffle*, а стандартный экспрессионный штамм *E. coli* *BL21(DE3)* использован для сравнения. Основной проблемой гетерологической экспрессии однодоменных антител является необходимость обеспечения их эффективного фолдинга с замыканием дисульфидной связи, иначе антитела агрегируют внутри клеток с образованием телец включения. Для решения этой проблемы были использованы разработанные компанией Lucigen векторы pSol. Как проиллюстрировано на рисунке 11а, в векторах pSol на N-конце целевого белка располагается белок-партнер с высокой растворимостью, который быстро фолдируется и препятствует агрегации всей химерной молекулы. Таким образом, когда агрегация подавлена, антитело может фолдироваться и сформировать внутримолекулярную дисульфидную связь с помощью изомеразы DsbC в окислительной цитоплазме *E. coli* *SHuffle*.



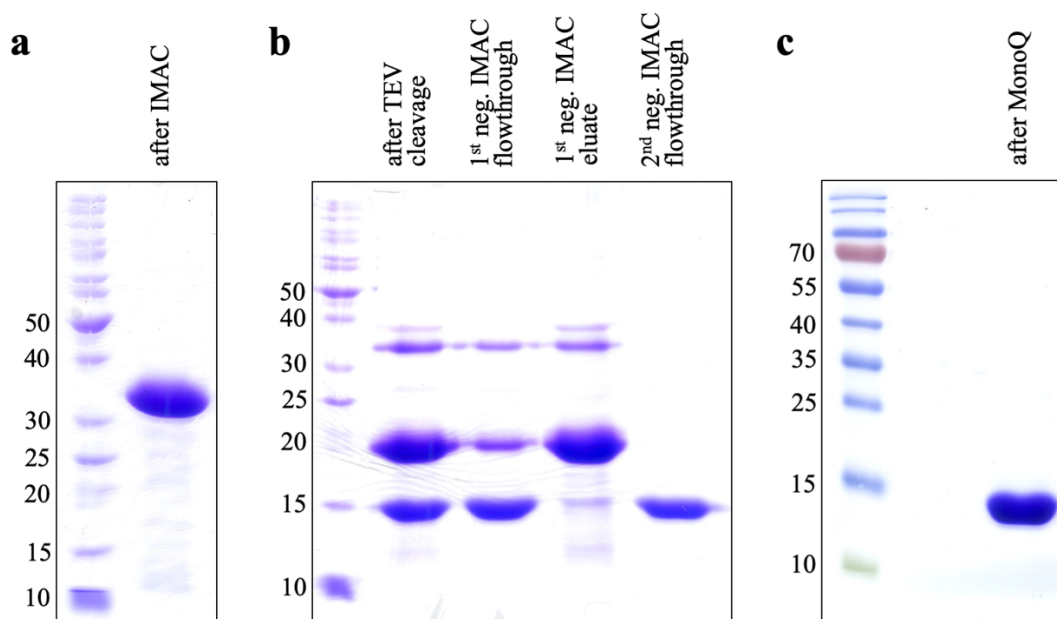
**Рисунок 11** — Схема экспрессии и очистки рекомбинантных однодоменных антител. **(a)** Структура химерных белков с SUMO и однодоменным антителом (сверху); гистидиновый таг (His<sub>6</sub>) и белок SUMO на N-конце удаляются при помощи TEV протеазы. Структура белка *pelB-BCD090-P1-His<sub>5</sub>*, получаемого при периплазматической экспрессии (снизу). **(b)** Схемы выделения и очистки рекомбинантных однодоменных антител при цитоплазматической и периплазматической экспрессии в бактериях *E. coli*.

В роли таких вспомогательных белков обычно выступают тиоредоксин (TRX), глутатион S-трансфераза (GST) и мальтоза-связывающий белок (MBP). Векторы pSolGST и pSolMBP, имеющиеся среди прочих в системе Expresso (Lucigen), были протестированы в предварительных экспериментах и не показали существенного увеличения эффективности экспрессии однодоменных антител. В результате для дальнейшей работы был выбран вектор pSolSUMO, в котором вспомогательным белком выступает небольшой, всего 11 кДа, убиквитин-подобный

белок SUMO. Данный белок быстро фолдируется, обладает высокой растворимостью, а его небольшая масса по сравнению с GST и MBP увеличивает продуктивность экспрессии, т. к. антитело составляет большую долю химерной молекулы. Ранее, в систематическом сравнении различных химерных конструкций при прокариотической экспрессии, белок SUMO оказался наиболее эффективным партнером [224]. Кроме того, SUMO потенциально может быть удален при помощи специфической SUMO-протеазы, которая распознает не линейный фрагмент, а трехмерную структуру белка SUMO и высокоспецифично гидролизует пептидную связь на его С-конце. В данной работе была использована более традиционная схема расщепления химерного белка с использованием TEV протеазы.

После создания генетических конструкций на основе векторов pSolSUMO как описано в Главе 2, была разработана схема цитоплазматической экспрессии и очистки однодоменных антител, приведенная на рисунке 11b. Рамнозный промотор pRha в векторах pSolSUMO позволяет практически линейно контролировать уровень продукции белка путем варьирования концентрации индуктора, *L*-рамнозы. Наилучшие результаты были получены при длительной (15 часов) индукции высокими концентрациями *L*-рамнозы (5–10 мМ) при пониженной температуре 27–29 °С. Благодаря высокой растворимости SUMO, при данных условиях практически весь химерный белок находился в растворимой фракции. Лизис клеток осуществлялся при помощи ультразвуковой гомогенизации, после чего экстракты подвергались центрифугированию и фильтрации. В протокол был включен этап преципитации сульфатом аммония, что позволило эффективно удалить из экстракта остаточные липиды и нуклеиновые кислоты. Судя по измерениям поглощения на 260/280 нм, доля нуклеиновых кислот была снижена до 5% после преципитации, что позволило увеличить производительность металл-хелатной хроматографии.

В ходе очистки однодоменных антител на каждом этапе проводился электрофорез в полиакриламидном геле для оценки чистоты и гомогенности белков, а также определения эффективности протеолиза при обработке TEV. Пример такого анализа для антитела BCD090-P1 приведен на рисунке 12. На первом хроматографическом этапе белок выделялся при помощи металл-хелатной хроматографии, которая использовала N-концевой гистидиновый таг в белках. Для хроматографии применялись сорбенты cOmplete нового поколения с пентадентатным лигандом Ni<sup>2+</sup>, что позволяло использовать EDTA для ингибирования протеаз. Как правило, уже после первого этапа химерный белок обладал чистотой более 90%, как видно из рисунка 12a.

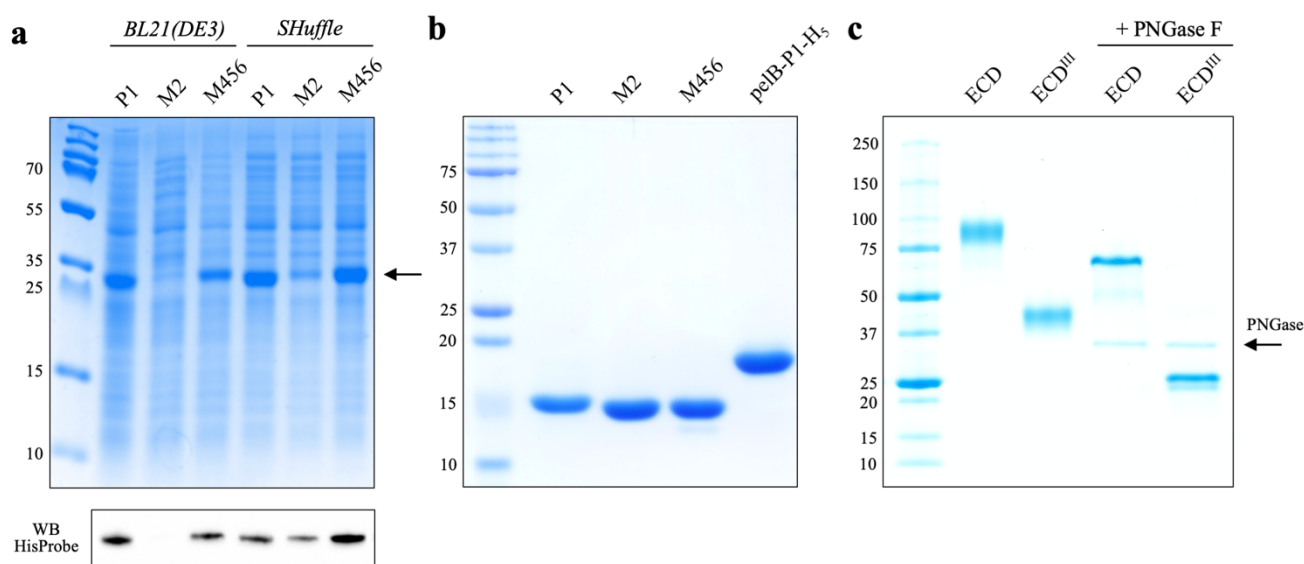


**Рисунок 12** — Анализ химерных белков и однодоменных антител на разных этапах очистки. **(а)** Химерный белок *His<sub>6</sub>-SUMO-BCD090-P1* после выделения при помощи металл-хелатной хроматографии. Слева указаны молекулярные массы стандартов в кДа; химерный белок имеет расчетную массу 27 кДа, но мигрирует в районе 35 кДа из-за свойств гистидинового тага и SUMO. **(б)** Расщепление химерного белка протеазой TEVpM2 и удаление белков с гистидиновыми тагами при помощи негативной металл-хелатной хроматографии. Однодоменное антитело мигрирует вблизи 15 кДа как и ожидается, белок *His<sub>6</sub>-SUMO* мигрирует аномально вблизи 20 кДа. **(с)** Результаты дополнительной очистки при помощи анионообменной хроматографии высокого разрешения (MonoQ). Белок абсолютно гомогенный, примеси не детектируются.

После выделения химерного белка проводился диализ и затем протеолиз при помощи рекомбинантной протеазы TEVpM2 для удаления SUMO с гистидиновым тагом. Как правило, не менее  $\frac{3}{4}$  химерного белка было расщеплено при четырехчасовой инкубации с ферментом в концентрациях от  $\frac{1}{40}$  до  $\frac{1}{80}$  от субстрата. Затем нерасщепленный химерный белок, *His<sub>6</sub>-SUMO* и TEV протеаза были удалены при помощи негативной металл-хелатной хроматографии. Ввиду высокой растворимости и малого количества гистидинов, однодоменные антитела практически не связывались с Ni-NTA сорбентом. Как видно из рисунка 12b, контаминирующие белки после первой металл-хелатной хроматографии были также эффективно удалены на этом этапе. Для достижения максимальной молекулярной гомогенности однодоменные антитела затем очищались при помощи ионообменной хроматографии высокого разрешения. В случае антитела BCD090-P1, обладающего низкой изоэлектрической точкой, использовалась анионообменная хроматография (MonoQ). Два других антитела являются основными белками, поэтому для них использовалась катионообменная хроматография на колонке MonoS. Во всех случаях однодоменные антитела были элюированы в виде одиночных пиков при ионной силе,

эквивалентной 0.2 М NaCl. Для структурных исследований дополнительно проводилась смена буфера при помощи препаративной гель-фильтрации.

В результате применения разработанной системы цитоплазматической экспрессии были получены растворимые фолдированные однодоменные антитела высокой степени гомогенности без молекулярных тагов. Анализ всех полученных рекомбинантных белков приведен на рисунке 13. Очистка рекомбинантных фрагментов рецептора ErbB3 осуществлялась аналогичным образом, но без дополнительной ионообменной хроматографии. Из-за сильного гликозилирования белков, полученные фрагменты были проанализированы в нативной форме и после полного дегликозилирования в денатурирующих условия при помощи PNGазы F (рисунок 13с). Наблюдаемые молекулярные массы фрагментов соответствовали расчетным.



**Рисунок 13** — Экспрессия и очистка однодоменных антител и фрагментов рецептора ErbB3. **(а)** Гель-электрофорез и вестерн-блоттинг растворимых экстрактов при экспрессии антител в *E. coli* BL21(DE3) либо *E. coli* SHuffle. Стрелка указывает на полосы, соответствующие экспрессируемому химерному белку. Антитело BCD090-M2 экспрессируется в растворимой форме только в клетках *E. coli* SHuffle, что подтверждается вестерн-блоттингом с детекцией гистидинового тага (панель снизу). **(б)** Анализ очищенных однодоменных антител. Полученное в периплазме антитело мигрирует выше, предположительно из-за неотщепленного пептида *pelB* и гистидинового тага. **(с)** Анализ полученных эктодомена рецептора ErbB3 (ECD, мол. масса ~7 кДа) и субдомена III (ECD<sup>III</sup>, мол. масса ~25 кДа). Фрагменты рецептора проанализированы в нативной гликозилированной форме и после дегликозилирования PNGазой F. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225] с изменениями.

### 3.2.2 Цитоплазматическая экспрессия имеет большую эффективность чем классическая система периплазматической экспрессии

Вслед за разработкой системы гетерологической экспрессии однодоменных антител был изучен вопрос ее эффективности. Для этого проведено сравнение предложенного метода цитоплазматической экспрессии с классическим методом получения антител в периплазме [178; 190]. Также для экспрессии в цитоплазме помимо *E. coli SHuffle* использован стандартный экспрессионный штамм *E. coli BL21(DE3)* для сравнения их продуктивности. Дополнительно изучено влияние редких кодонов в последовательностях однодоменных антител.

Сравнение проведено при росте бактерий в самой богатой стандартной лабораторной среде Terrific Broth (TB), которая буферирована фосфатом от закисления при длительной культивации. Результаты сравнения различных методов экспрессии приведены в таблице 6. Финальная плотность клеток после завершения индукции оценивалась по оптическому поглощению и прямым измерением биомассы. Полученные значения соответствуют максимально достижимым при культивации в колбах [192]. Несмотря на литературные данные о том, что скорость роста клеток *SHuffle* не отличается от стандартных экспрессионных штаммов [191], полученная для этого штамма биомасса была практически на треть меньше, чем в случае *BL21(DE3)*.

**Таблица 6** — Результаты анализа эффективности цитоплазматической и периплазматической экспрессии однодоменных антител в *E. coli* штаммов *SHuffle* и *BL21(DE3)*. Все данные приведены в расчете на 1 литр клеточной культуры (среда TB). На этапах после протеолиза TEV приводятся значения для антител, полученных в *E. coli SHuffle*.

Экспрессия:	Цитоплазматическая <i>E. coli SHuffle</i> / <i>E. coli BL21(DE3)</i>			Периплазматическая <i>E. coli BL21(DE3)</i>
	BCD090-P1	BCD090-M2	BCD090-M456	pelB-BCD090-P1-His <sub>5</sub>
Финальная OD <sub>600</sub>	9.0 / 12.4	8.8 / 9.7	8.7 / 9.5	5.4
Масса клеток, г	14.0 / 20.8	14.4 / 18.0	12.8 / 18.4	9.4
Химерный белок, мг	146 / 266	48 / — <sup>1</sup>	184 / 118	9.5 <sup>2</sup>
Антитело после удаления тага, мг	58	16	72	—
Антитело после MonoQ/S, мг	49	13	60	7.0

<sup>1</sup> В случае антитела BCD090-M2 в *E. coli BL21(DE3)* не удалось получить растворимый белок

<sup>2</sup> Для периплазматической экспрессии приведена масса выделенного белка pelB-BCD090-P1-His<sub>5</sub> после металл-хелатной хроматографии

При этом все три химерных белка были успешно экспрессированы в *E. coli SHuffle* с продуктивностью от 48 до 184 мг на литр культуры. Напротив, в стандартном штамме *E. coli BL21(DE3)* экспрессия одного из антител, BCD090-M2, не удалась вовсе, несмотря на оптимизацию условий индукции. Как видно из вестерн-блоттинга с клеточными экстрактами на рисунке 13а, данный белок отсутствует в растворимой фракции при экспрессии в *E. coli BL21(DE3)*. По сравнению с экспрессией в цитоплазме, периплазматическая экспрессия антитела BCD090-P1 характеризуется более чем на порядок меньшей эффективностью, 9.5 мг против 146 мг. Помимо значительно более низкого уровня продукции белка, полученное однодоменное антитело вероятно имеет неотщепленный сигнальный пептид *relB*, судя по электрофоретической миграции белка в районе 17 кДа вместо расчетных 14 кДа (рисунок 13b). Известно, что протеолиз сигнального пептида не является необходимым условием транспорта белка в периплазму [226]. В разработанном подходе удаление молекулярных тагов в контролируемых условиях *in vitro* при помощи TEV протеазы позволяет добиться полной молекулярной гомогенности, не зависящей от особенностей функционирования SEC транслокона в бактериях.

В данной работе кодирующие антитела фрагменты были клонированы в экспрессионные векторы pSol без кодонной оптимизации. Таким образом распределение кодонов отражает их частоты у исходного организма (*лам*) и может быть неоптимальным для синтеза в *E. coli*. Анализ показал, что последовательности антител содержат особенно редкие у *E. coli* кодоны AGA, AGG (Arg), CTA (Leu), GGA (Gly), а суммарно 13–16% кодонов имеют частоты менее 10% у *E. coli*. Для компенсации разницы кодонных распределений была применена стратегия экспрессии редких тРНК с вспомогательной плазмиды, как это сделано в штамме *E. coli Rosetta 2* (Novagen). Для этого плазида pRARE2, кодирующая 7 редких тРНК и имеющая совместимый с векторами pSol ориджин репликации p15a, была выделена из клеток *E. coli Rosetta 2* и затем использована для трансформации *E. coli SHuffle*. Таким образом был создан штамм, объединяющий преимущества *SHuffle* и *Rosetta*. Несмотря на то, что экспрессия белков проводилась в присутствии двух антибиотиков, полученная биомасса существенно не уменьшилась по сравнению со стандартным экспериментом. Тем не менее, уровень экспрессии антител также практически не изменился. Данный результат может объясняться тем, что для относительно коротких белков, какими являются однодоменные антитела, вероятность терминации трансляции из-за наличия редкого кодона достаточно мала. Вероятно, при длительной индукции в разработанном протоколе достигается практическое насыщение уровня экспрессии, и продукция белка не лимитирована его растворимостью или доступностью тРНК.

Разработанная система гетерологической экспрессии однодоменных антител обладает эффективностью, превышающей опубликованные в научной литературе [187] и рассмотренные в Главе 1 клеточные системы. Продуктивность синтеза в данном исследовании находится

наравне с работой Zarschler и соавторов [192], в которой получено 120–175 мг однодоменного антитела к рецептору EGFR на литр культуры, что является максимумом для лабораторных систем. Однако в данной работе, в отличие от Zarchler и соавторов, реализовано полное удаление молекулярных тагов у однодоменных антител. Представленные результаты демонстрируют потенциал применения мутантных штаммов *E. coli* и химерных белков для получения однодоменных антител в биомедицине. В настоящее время развиваются подходы к синтезу полноразмерных антител в прокариотических системах, что ранее считалось практически невозможным. Прогресс в этой области рассмотрен в недавнем обзоре [227]. В частности, показана возможность синтеза полноразмерных антител с корректным фолдингом и спариванием белковых цепей в прокариотической системе, для чего использован именно штамм *E. coli* *SHuffle* [228]. Дальнейшее развитие этой системы может позволить усовершенствовать биотехнологию получения иммунотерапевтических белков различной структуры и сделать их производство более эффективным.

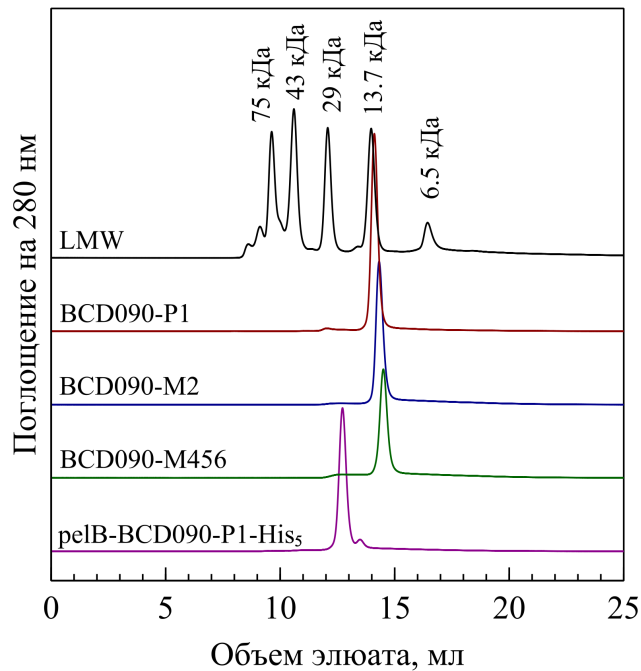
### **3.3 Структурные и биохимические характеристики однодоменных антител**

#### **3.3.1 Исследованные однодоменные антитела находятся в мономерной форме и обладают вторичной структурой, характерной для иммуноглобулинового домена**

Рекомбинантные однодоменные антитела были исследованы биохимическими и спектроскопическими методами для оценки того, фолдированы ли они, и изучения их агрегационной стабильности и вторичной структуры. Для определения гидродинамического размера белков применена гель-фильтрация высокого разрешения на колонке Superdex 75 Increase. В качестве калибровочных стандартов использован набор белков LMW с молекулярными массами от 6.5 до 75 кДа. Поскольку нативные белковые глобулы обладают меньшим гидродинамическим размером, чем рыхлые клубки денатурированных белков, аналитическая гель-фильтрация позволяет определить состояние молекулы. Как видно из приведенных на рисунке 14 хроматограмм, антитела BCD090-P1, BCD090-M2 и BCD090-M456 элюируются вблизи стандарта 13.7 кДа, рибонуклеазы А. Наблюдаемые характеристики хорошо согласуются с расчетными молекулярными массами антител, равными 13.4, 14.0 и 14.4 кДа, из чего можно заключить что все антитела обладают нативной фолдированной структурой. Ни для одного из белков не детектируется агрегация или отдельные олигомеры. Для полученного из периплазмы антитела *relB*-BCD090-P1-His<sub>5</sub> определенная по калибровочным стандартам молекулярная масса составляет 22 кДа, что больше расчетных значений как для белка без сигнального пептида (14 кДа), так и вместе с *relB* (16.4 кДа). Данный сдвиг предположительно



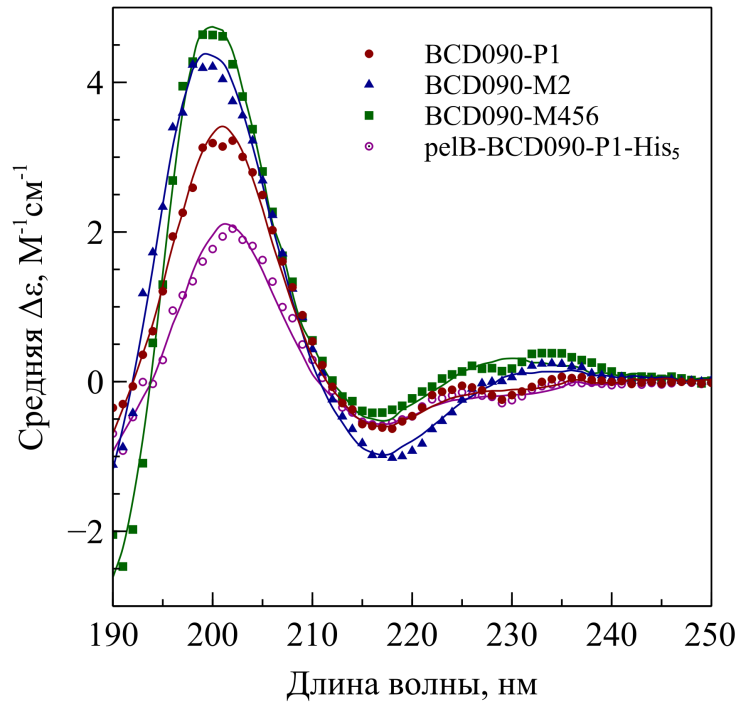
объясняется тем, что неструктурированные *pelB* и гистидиновый таг увеличивают гидродинамический радиус сильнее, чем можно ожидать для глобулярного белка той же массы.



**Рисунок 14** — Исследование однодоменных антител при помощи аналитической гель-фильтрации. Все антитела находятся в мономерной форме. Антитела BCD090-P1, BCD090-M2 и BCD090-M456 элюируются вблизи стандарта 13.7 кДа, что свидетельствует об их компактной фолдированной форме. Антитело *pelB*-BCD090-P1-His<sub>5</sub> элюируется раньше, предположительно из-за неотщепленного *pelB* и гистидинового тага. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225] с изменениями.

Для изучения вторичной структуры однодоменных антител были измерены и проанализированы спектры кругового дихроизма (КД) в дальнем УФ-диапазоне. Явление кругового дихроизма в белках связано с различным поглощением лево- и правополяризованного света пептидными связями. Различия в стереохимии пептидных групп в элементах вторичной структуры белков —  $\alpha$ -спиралях,  $\beta$ -листах и  $\beta$ -изгибах — влекут за собой формирование особых, характерных для каждого типа структуры, спектров кругового дихроизма. Вследствие этого, анализ КД является классическим подходом для определения вторичной структуры белков [229]. Экспериментальные спектры кругового дихроизма для исследуемых антител и их аппроксимация приведены на рисунке 15. Анализ спектров КД для преимущественно  $\beta$ -структурных белков представляет сложность ввиду большой структурной вариативности различных форм  $\beta$ -листов. В отличие от структурно неизменной  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -листы различных типов могут отличаться как паттерном водородных связей (антипараллельные  $\uparrow\downarrow$  и параллельные  $\uparrow\uparrow$   $\beta$ -листы), так и пространственной конфигурацией

(левозакрученные, релаксированные, правозакрученные). Вариативность  $\beta$ -структур порождает большое разнообразие спектров КД и классические алгоритмы *деконволюции*, т. е. разложения спектров на компоненты, например *SELCON* и *CONTIN*, плохо справляются с анализом  $\beta$ -структурных белков.



**Рисунок 15** — Анализ вторичной структуры однодоменных антител при помощи спектроскопии кругового дихроизма. Экспериментальные данные показаны символами, результаты аппроксимации обозначены линиями. Деконволюция спектров при помощи алгоритма *BeStSel* позволяет определить содержание компонентов вторичной структуры. Все антитела имеют структуру с преимущественно антипараллельными  $\beta$ -листами и  $\beta$ -изгибами, типичную для иммуноглобулинового фолда. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225] с изменениями.

В данной работе был применен новый вычислительный алгоритм деконволюции спектров КД, называемый “ *$\beta$ -structure selection (BeStSel)*”, специально разработанный для анализа белков с разнообразной  $\beta$ -структурой [209; 210]. Как видно из рисунка 15, вычисленные в результате деконволюции спектры прекрасно аппроксимируют экспериментальные данные с нормированным среднеквадратичным отклонением менее 4%. Определенные при помощи *BeStSel* доли содержания различных компонентов вторичной структуры приведены в таблице 7.

**Таблица 7** — Результаты деконволюции спектров кругового дихроизма. Доли элементов вторичной структуры, а также архитектура и топология белков определены при помощи алгоритма *BeStSel*.

	<b>BCD090-P1</b>	<b>BCD090-M2</b>	<b>BCD090-M456</b>	<b>pelB-BCD090-P1-His<sub>5</sub></b>	
Архитектура	β-сэндвич	β-сэндвич	β-сэндвич	β-сэндвич	
Топология	Ig фолд	Ig фолд Jelly Roll	Jelly Roll Ig фолд	Ig фолд	
α-спираль, %	0.0	0.9	0.9	0.0	
↑↑ β-лист, %	5.5	5.8	0.0	6.7	
β-лист	левозакрученный, %	8.9	10.5	11.9	7.1
	релаксированный, %	51.9	48.8	53.4	46.8
↕	правозакрученный, %	23.9	24.6	25.1	20.5
		19.1	13.7	16.4	19.2
β-изгиб, %	9.5	8.2	9.0	10.7	
Coil, % <sup>1</sup>	33.2	36.3	36.7	35.8	
Ср. кв. отклонение, % <sup>2</sup>	2.7	2.5	2.0	3.3	

<sup>1</sup> Доля неупорядоченных (“coil”) участков либо участков с другой структурой, не относящейся к стандартным элементам вторичной структуры.

<sup>2</sup> Нормированное среднее квадратичное отклонение полученной аппроксимации от экспериментального спектра кругового дихроизма (NRMSD).

Анализ спектров КД выявил, что все антитела характеризуются преобладанием антипараллельной β-структуры и практически полным отсутствием α-спиралей и параллельных β-листов, что характерно для иммуноглобулинового домена. Количественные данные по содержанию β-структуры согласуются со спектроскопическими данными для классических Fab фрагментов [230] и с множеством кристаллических структур антител. Алгоритм *BeStSel* позволяет в некоторых случаях определить не только доли элементов вторичной структуры, но и структурные данные более высокого порядка, например архитектуру и топологию (фолд) белка. В случае всех исследованных однодоменных антител спектры однозначно соответствовали архитектуре типа β-сэндвич. Все спектры были ассоциированы с топологией иммуноглобулинового домена (Ig фолд) либо с родственным фолдом типа “Jelly Roll”. Таким образом можно заключить, что количественный анализ вторичной структуры и топологии белков путем деконволюции спектров кругового дихроизма однозначно свидетельствует о корректном фолдинге полученных рекомбинантных однодоменных антител.

### 3.3.2 Однодоменные антитела BCD090-P1 и BCD090-M2, но не BCD090-M456, имеют каноническую дисульфидную связь

Вслед за исследованием вторичной структуры, топологии и агрегационного состояния однодоменных антител, их посттрансляционные модификации были изучены биохимическими методами и масс-спектрометрией высокого разрешения. При помощи биохимического анализа были определены редокс-состояния двух цистеинов в антителах, Cys<sub>22</sub> и Cys<sub>92</sub>. В иммуноглобулинах эти два консервативных остатка цистеина формируют внутримолекулярную дисульфидную связь, соединяющую β-листы В и F у основания петель CDR1 и CDR3 как показано на рисунке 4с. Были использованы два комплементарных эксперимента с реагентом Элмана и реактивом NTSB для количественного определения тиольных групп (S–H) и дисульфидных связей (S–S), соответственно. При этом дисульфидные связи определяются не напрямую, а как 1/2 от числа цистеинов, детектируемых после восстановления белков при помощи сульфита натрия. Результаты экспериментов представлены в таблице 8. Оба антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 имеют одиночную дисульфидную связь, при этом свободные цистеины в них не детектируются, как и ожидается для нативной конформации. Неожиданно, BCD090-M456 не имеет дисульфидной связи, поскольку одна свободная тиольная группа на каждую молекулу белка детектируется реагентом Элмана.

*Таблица 8 — Свободные цистеины и дисульфидные связи в однодоменных антителах по результатам теста Элмана и измерений с NTSB после восстановления с Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Лизоцим использован в качестве контроля в обоих экспериментах.*

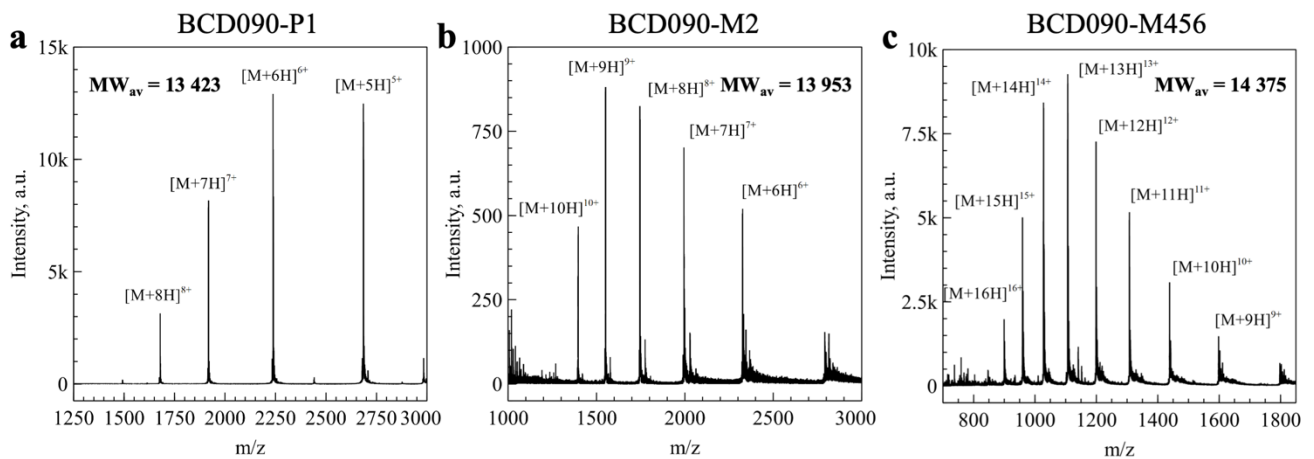
Белок	Свободные цистеины (S–H)		Дисульфидные связи (S–S)	
	расчет	по Элману	расчет	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> + NTSB
BCD090-P1	0	< 0.02 <sup>1</sup>	1	0.96 ± 0.03
BCD090-M2	0	< 0.02 <sup>1</sup>	1	1.00 ± 0.01
BCD090-M456	0	0.97 ± 0.07	1	0.83 ± 0.10
Лизоцим (контроль)	0	< 0.02 <sup>1</sup>	4	3.1 ± 0.4

<sup>1</sup> Для данных образцов изменение поглощения NTB не детектируется спектрофотометрически

Присутствие только одной свободной тиольной группы на молекулу антитела ставит вопрос о редокс-состоянии второго остатка цистеина. Оставшийся цистеин не формирует межмолекулярную дисульфидную связь, поскольку антитело находится в мономерной форме по данным аналитической гель-фильтрации. Экспериментальные данные объясняются тем, что оба цистеина в антителе BCD090-M456 вероятно находятся в восстановленной форме, но один из них не реагирует с реагентом Элмана из-за стереохимических или электростатических особенностей

его окружения, как наблюдается в некоторых белках [231; 232]. Вопреки общим представлениям, отсутствие консервативной дисульфидной связи не мешает данному антителу иметь нативную конформацию иммуноглобулинового домена.

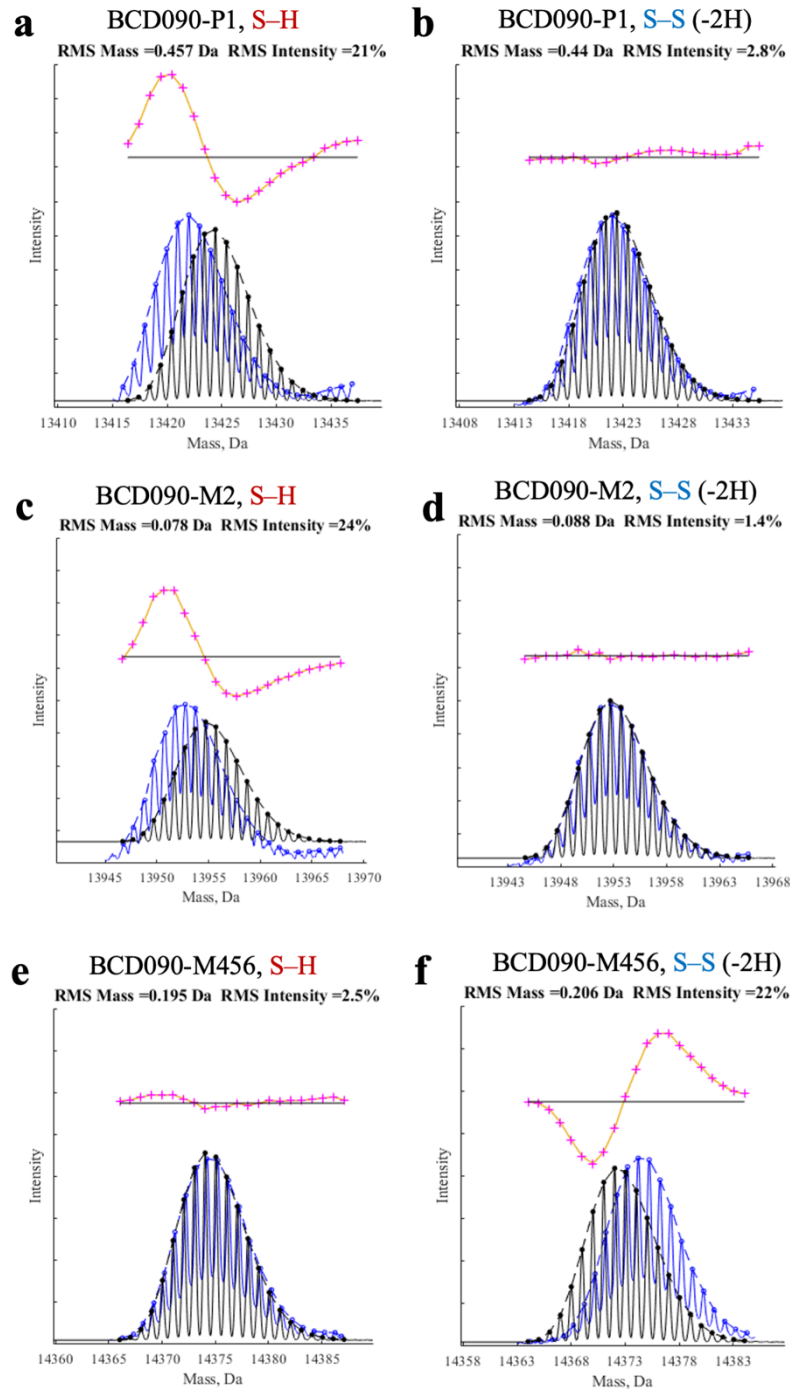
Для точного определения молекулярной массы и посттрансляционных модификаций однодоменных антител были проведен их анализ при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения с электроспреей ионизацией. Как видно из рисунка 16 с полученными масс-спектрами, антитела характеризуются высокой молекулярной гетерогенностью и отсутствием детектируемых примесей.



**Рисунок 16** — Анализ однодоменных антител при помощи высокоразрешающей масс-спектрометрии с электроспреей ионизацией. Данные приведены для **(a)** BCD090-P1; **(b)** BCD090-M2 и **(c)** BCD090-M456. Отмечены пики отдельных зарядовых состояний  $[M+nH]^{n+}$ , где  $n$  — количество протонов, и вычисленные средние молекулярные массы  $M$ . Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225] с изменениями.

После деконволюции зарядовых состояний и получения усредненного масс-спектра был предпринят анализ небольших отклонений от расчетной молекулярной массы вследствие формирования дисульфидной связи ( $-2$  Да) или других посттрансляционных модификаций, например дезамидирования аспарагина ( $+1$  Да). Поскольку прямой анализ таких малых изменений массы белка затруднен естественным изотопным распределением, стандартная стратегия заключается в применении методов фрагментации и последующем исследовании MS2 спектров полученных пептидов [233]. В данном исследовании был применен альтернативный подход, разработанный Rhoads и соавторами для того, чтобы масс-спектрометрически различить ионы меди и цинка в комплексе с супероксиддисмутазой [212]. В этом методе теоретическое изотопное распределение рассчитывается для каждой рассматриваемой брутто-формулы белка и используется для аппроксимации экспериментально измеренного масс-спектра. Затем

проводится анализ того, какая брутто-формула наилучшим образом описывает эмпирические данные.



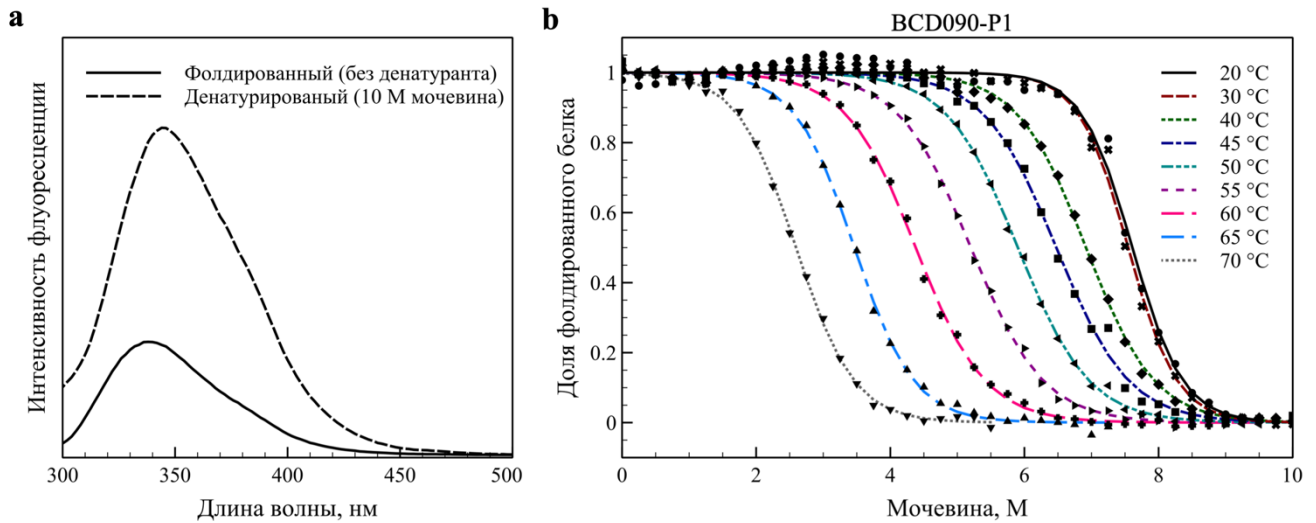
**Рисунок 17** — Анализ изотопных распределений в масс-спектрах для выявления посттрансляционных модификаций однодоменных антител. Экспериментальные данные показаны синим цветом, расчетные — черным. Аппроксимация данных для BCD090-P1 в предположении свободных цистеинов (**a**) либо дисульфидной связи (**b**). Распределение с S-S связью прекрасно описывает эксперимент. (**c**) и (**d**) То же для BCD090-M2. (**e**) и (**f**) В случае BCD090-M456 лучшую аппроксимацию дает формула для восстановленных цистеинов (S-H). Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225].

После тестирования на лизоциме, данный подход был применен для анализа однодоменных антител. На рисунке 17 представлены полученные в эксперименте масс-спектры (синим) и расчетные изотопные распределения (черным). Характерные осцилляции отвечают разному количеству изотопов  $^{13}\text{C}$  в молекулах белков, соседние пики в серии отличаются на один «тяжелый» атом углерода. Огибающая линия описывает изотопное распределение, а положение ее максимума соответствует средней молекулярной массе. Как видно из сравнения панелей (a) и (b) а также (c) и (d) на рисунке 17, для антител BCD090-P1 и BCD090-M2 наилучшие аппроксимации экспериментальных данных получены в предположении существования дисульфидной связи ( $-2\text{H}$ ). Напротив, для антитела BCD090-M456 эксперимент лучше описывается формулой со свободными тиольными группами (рисунок 17e), что согласуется с биохимическими экспериментами. Помимо детектирования дисульфидных связей, масс-спектрометрия также подтверждает точное расщепление химерного белка TEV протеазой и отсутствие нежелательных посттрансляционных модификаций. Все однодоменные антитела демонстрируют высокую молекулярную гомогенность. Таким образом, в результате использования комбинации биохимических и масс-спектрометрических методов были изучены редокс-состояния антител и обнаружено, что молекула BCD090-M456 в отличие от BCD090-P1 и BCD090-M2 не формирует консервативной дисульфидной связи. В настоящем исследовании для определения редокс-состояний впервые был применен анализ изотопных распределений в масс-спектрах интактных белков.

### **3.3.3 Однодоменное антитело BCD090-P1 обладает уникальной термодинамической стабильностью**

Одним из неоспоримых преимуществ однодоменных антител является их высокая конформационная стабильность, то есть способность сохранять нативную структуру при высоких температурах и в присутствии денатурирующих веществ. Для изучения термодинамики фолдинга полученных однодоменных антител были изучены их равновесные кривые денатурации, полученные при различных концентрациях мочевины и температурах. Мочевина взаимодействует с пептидными группами в белках и при больших концентрациях, обычно в диапазоне 2–4 М, вызывает их денатурацию, сопровождающуюся конформационным переходом из плотного глобулярного состояния в неупорядоченный клубок. При этом может меняться собственная флуоресценция триптофановых остатков в белке, которая чувствительна к микроокружению внутри гидрофобного ядра белка. В рамках данного исследования было установлено, что спектр собственной флуоресценции триптофанов в однодоменных антителах

претерпевает значительные изменения при переходе клубок-глобула (рисунок 18а), в результате чего была разработана методика измерения кривых денатурации [234].

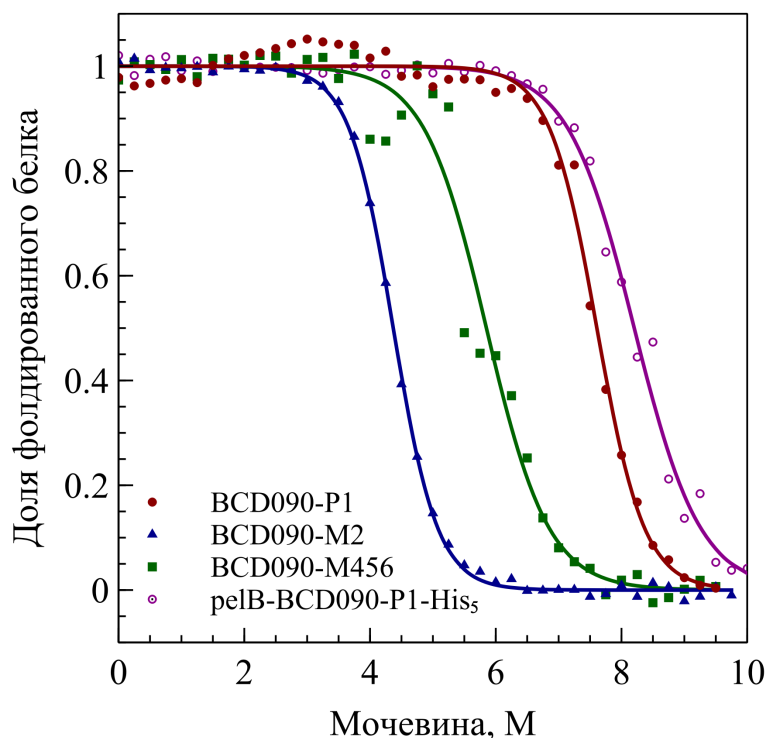


**Рисунок 18** — Исследования конформационной стабильности однодоменных антител. **(а)** Пример спектров собственной триптофановой флуоресценции для нативного и полностью денатурированного антитела. Изменения спектров использовались для построения кривых денатурации. **(б)** Полученные кривые денатурации для антитела VCD090-P1 при температурах 20–70 °С. Символами показаны экспериментальные значения, линиями результаты аппроксимации. Антитело обладает уникальной стабильностью, и даже при 70 °С денатурирует только в присутствии 2.5 М мочевины. Панель (а) приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [234].

На рисунке 18b представлены экспериментальные кривые денатурации и их аппроксимации в модели 2 состояний. Как видно из представленных результатов, денатурация однодоменного антитела VCD090-P1 прекрасно описывается теоретической моделью фолдинга «все или ничего». Измеренные при температурах 20 °С и 30 °С кривые практически неразличимы, и половинная денатурация, т. е. состояние, в котором 50% молекул антитела денатурированы, достигается только при 7.6 М мочевины. Такая высокая концентрация денатуранта характеризует высочайшую конформационную стабильность антитела VCD090-P1. При повышении температуры кривые денатурации естественно сдвигаются в область более низких концентраций мочевины. Удивительно, но даже при температуре 70 °С антитело остается фолдированным и денатурирует только при 2.5 М мочевины. Для сравнения, средняя температура денатурации ( $T_m$ ) для 1 003 изученных на данный момент белков *H. sapiens* из наиболее полной базы данных термодинамических характеристик белков ProThermDB [235] составляет  $56.2 \pm 6.6$  °С ( $\pm$  стандартное отклонение). Аналогичные серии экспериментов были проведены для других



однодоменных антител, и сравнение полученных для них кривых денатурации приведено на рисунке 19.



**Рисунок 19** — Сравнение кривых денатурации однодоменных антител BCD090-P1, BCD090-M2 и BCD090-M456. Приведены кривые денатурации для температуры 20 °С. Символами показаны экспериментальные значения, линиями результаты аппроксимации. BCD090-P1 демонстрирует максимальную стабильность с половинной денатурацией при 8 М мочевины. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225].

В таблице 9 приведены рассчитанные значения концентрации мочевины, при которой достигается денатурация половины молекул ( $Urea_{1/2}$ ), коэффициента пропорциональности между концентрацией денатуранта и свободной энергией ( $m$ ) и свободные энергии денатурации ( $\Delta G_{H2O}$ ).

**Таблица 9** — Результаты аппроксимации кривых денатурации однодоменных антител. Значения приведены для температуры 20 °С ( $\pm$  стандартное отклонение).

	Концентрация мочевины $Urea_{1/2}$ , М	Коэффициент $m$ , ккал моль <sup>-1</sup> М <sup>-1</sup>	Свободная энергия $\Delta G_{H2O}$ , ккал моль <sup>-1</sup>
BCD090-P1	7.60 ± 0.05	1.54 ± 0.19	11.7 ± 1.4
BCD090-M2	4.37 ± 0.01	1.65 ± 0.03	7.2 ± 0.16
BCD090-M456	5.85 ± 0.07	1.17 ± 0.13	6.9 ± 0.8
pelB-BCD090-P1-His5	8.20 ± 0.05	1.10 ± 0.10	9.1 ± 0.8

Как видно из рисунка 19 и данных в таблице 9, все три антитела демонстрируют высокую стабильность с половинной денатурацией при более чем 4 М мочевины. Уникальная устойчивость антитела BCD090-P1 отчасти может быть объяснена особенностями строения его каркасных областей. Так, Kunz и соавторами было проведено систематическое исследование стабильности однодоменных антител и показано, что особенно сильным и статистически значимым стабилизирующим эффектом обладают две аминокислотные замены на N-конце белков, Q1E и Q5V [173]. Все три исследуемых антитела имеют замену Q5V, но только у BCD090-P1 также есть Q1E. Помимо этого, BCD090-P1 имеет замену A14P, которая нехарактерна для антител верблюдовых, но часто встречается у IgG человека. Вероятно, данный пролин, расположенный сразу после  $\beta$ -листа А, стабилизирует  $\beta$ -изгиб между ним и  $\beta$ -листом В.

Отсутствие дисульфидной связи в BCD090-M456 не мешает данному антителу иметь высокую термодинамическую стабильность. Интересно отметить, что полученные термодинамические характеристики коррелируют с уровнем экспрессии однодоменных антител в бактериях. Так, менее стабильное антитело, BCD090-M2, в *E. coli SHuffle* синтезируется наименее эффективно, а в *E. coli BL21(DE3)* вовсе не экспрессируется в растворимой форме. Напротив, биосинтез BCD090-P1 хорошо идет в обоих штаммах, а эффективность максимальна среди всех трех однодоменных антител. Резюмируя, можно заключить что исследованные однодоменные антитела, в особенности BCD090-P1, обладают высокой конформационной стабильностью, что принципиально важно для их практического применения в качестве новых иммунотерапевтических средств.

### 3.4 Исследование пространственных структур высокого разрешения

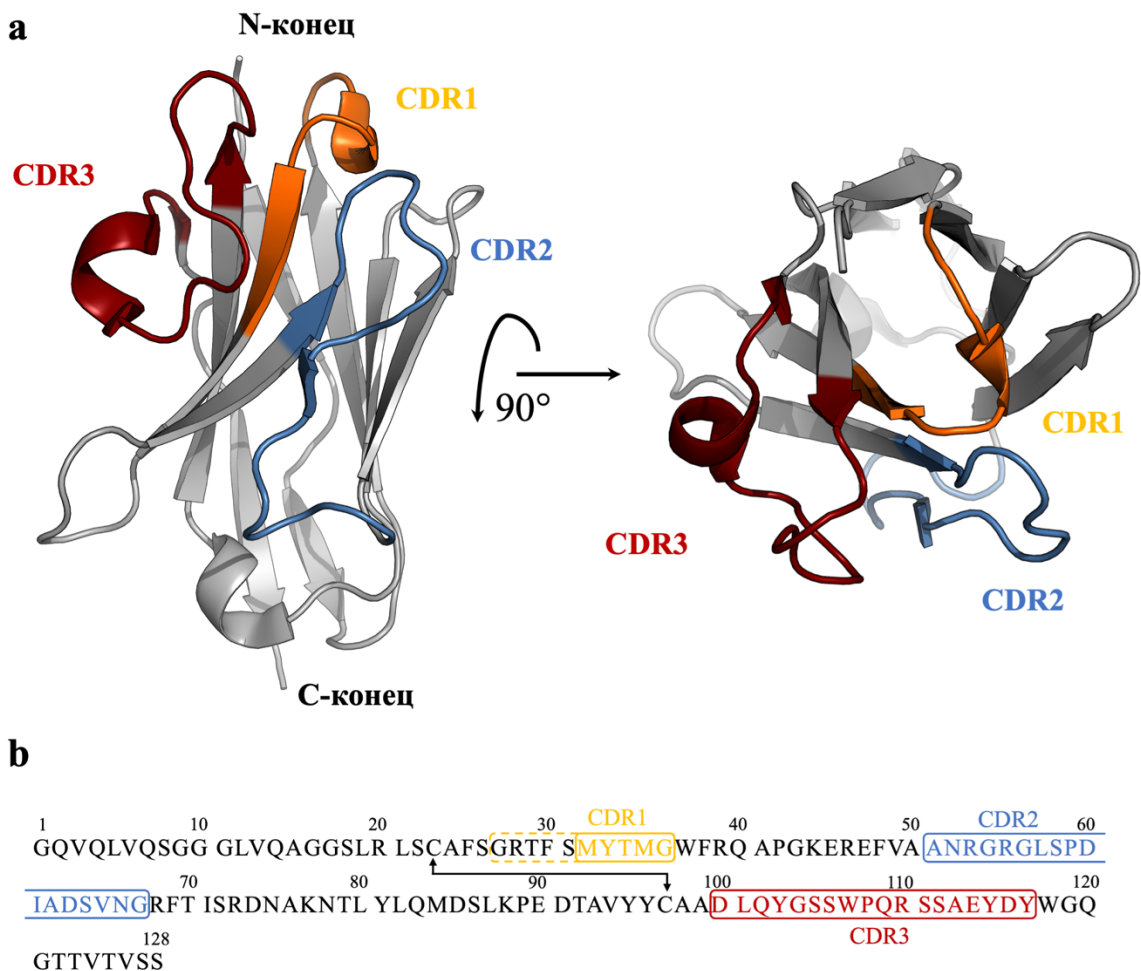
#### 3.4.1 Изучение пространственных структур однодоменного антитела BCD090-M2 в различных кристаллических формах

Для детального изучения пространственной структуры однодоменное антитело BCD090-M2 было кристаллизовано в двух различных формах. В одной форме (далее соответствующая модель называется **6EZW**) кристаллы имели пространственную группу C2 и единственную молекулу антитела в асимметричной части элементарной ячейки. В другой форме (далее модель называется **6F0D**) кристаллы обладали триклинной ячейкой (группа P1) с двумя независимыми молекулами антитела и двумя ионами кадмия. После съемки и первичной обработки рентгеновских данных, проведенных как описано в Главе 2, дальнейший анализ — а именно расчет фаз, построение моделей и их уточнение — проводился в программном пакете *Phenix* [236]. Характеристики измеренных рентгеновских данных, а также параметры и статистика валидации построенных моделей 6EZW и 6F0D, приведены в таблице 10.

**Таблица 10** — Статистика рентгеновских данных и параметры моделей 6EZW и 6F0D для антитела BCD090-M2. В скобках приведены значения для области наивысшего разрешения.

	Структура PDB:6EZW	Структура PDB:6F0D
<b>Условия проведения экспериментов</b>		
Дифрактометр	Карра Apex II (Bruker AXS)	Карра Apex II (Bruker AXS)
Детектор	Ареx II CCD	Ареx II CCD
Температура, К	100.0	293.15
Дистанция до детектора, мм	38	38
Ширина дифрактограмм, °	1.0	1.0
Количество дифрактограмм	599	2613
Длина волны, Å	1.54184	1.54184
<b>Характеристики полученных рентгеновских данных</b>		
Диапазон разрешения, Å	33.3–1.598 (1.656–1.598)	32.34–1.9 (1.968–1.9)
Пространственная группа	C 1 2 1	P 1
Параметры элементарной ячейки: a – b – c, Å, $\alpha$ – $\beta$ – $\gamma$ , °	65.76 — 38.93 — 47.48 90 — 102.24 — 90	35.77 — 41.53 — 46.49 89.99 — 67.92 — 76.06
Количество рефлексов	80 881 (3 994)	246 903 (9 578)
— уникальных	15 511 (1 365)	18 859 (1 885)
Избыточность данных	5.2 (2.9)	13.1 (5.1)
Полнота данных, %	96.50 (81.41)	96.75 (91.94)
Среднее I/ $\sigma$	13.89 (2.06)	14.86 (2.26)
Wilson B-factor	9.36	15.28
R-merge — R-pim	0.073 (0.446) — 0.033 (0.296)	0.144 (0.806) — 0.040 (0.406)
CC1/2	0.998 (0.794)	0.997 (0.412)
<b>Параметры построенных моделей и их валидация</b>		
Рефлексов для уточнения	15 157 (1 266)	18 248 (1 733)
Рефлексов для расчета R-free	1 517 (126)	1 829 (174)
R-work — R-free	0.182 (0.28) — 0.213 (0.288)	0.174 (0.257) — 0.218 (0.322)
CC(work) — CC(free)	0.964 (0.810) — 0.945 (0.778)	0.971 (0.828) — 0.951 (0.674)
Аминокислотных остатков	128	256
Атомов: белок – лиганд – H <sub>2</sub> O	981 — 0 — 190	1962 — 2 — 155
Ср. кв. откл.: связи Å — углы °	0.006 — 0.82	0.014 — 1.53
Карта Рамачандрана		
— оптимальные, %	98.41	97.22
— допустимые, %	1.59	2.78
— недопустимые, %	0.00	0.00
Нестандартные ротамеры, %	0.78	1.96
Средний B-фактор	14.36	19.86

Для решения структуры методом молекулярного замещения был выделен набор моделей однодоменных антител в базе данных PDB с наибольшей гомологией с BCD090-M2. Данные структурные модели были вручную модифицированы в программе *Sculptor* [237] для удаления не соответствующих BCD090-M2 остатков и использованы для расчета фаз путем молекулярного замещения в программе *Phaser* [238]. Наилучшие результаты расчета фаз получены с моделью нанотела к рецептору комплемента *Vsig4*, PDB:5IMK [239]. Затем каркасные области модели антитела BCD090-M2 построены автоматически с использованием *Phenix.AutoBuild* [240], а гипервариабельные участки CDR вручную вписаны в экспериментальные карты электронной плотности при помощи *Coot* [241]. После нескольких циклов уточнения в программе *Phenix.Refine* [242], полученные структуры депонированы в базу данных PDB под номерами 6EZW и 6F0D и опубликованы в статье по результатам исследования [243]. Полученная структура 6EZW приведена на рисунке 20.



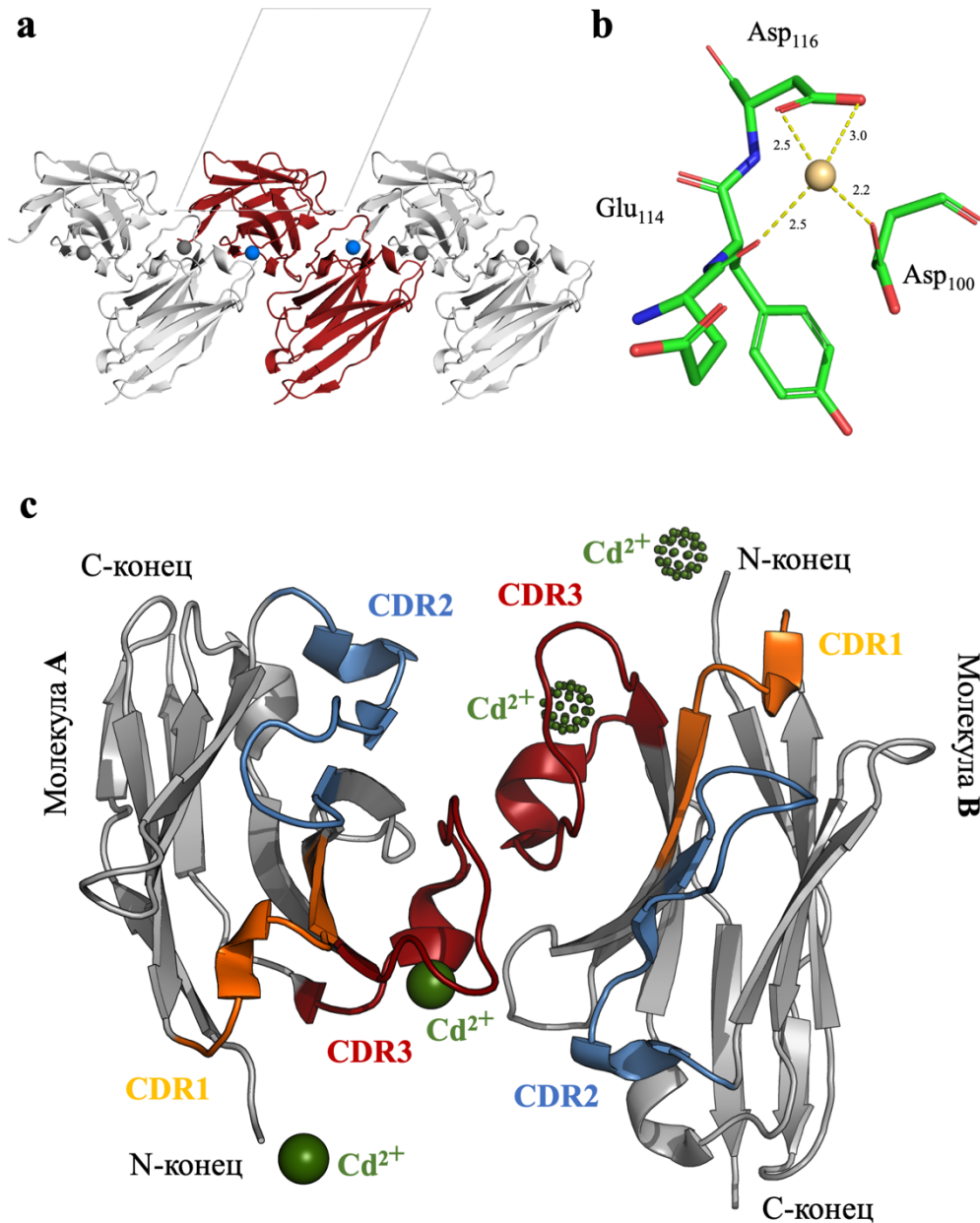
**Рисунок 20** — Кристаллическая структура антитела BCD090-M2, полученная в пространственной группе  $C2$  с разрешением  $1.6 \text{ \AA}$  (PDB:6EZW). **(a)** Схематичное изображение структуры в двух ориентациях, каркасные области серые, CDR отмечены цветом. **(b)** Последовательность антитела с обозначением CDR, нумерация соответствует PDB файлам. Рисунок приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [243].

Каркасные области антитела на рисунке 20а изображены серым, а гипервариабельные участки отмечены разными цветами. Для определения границ CDR в последовательностях использовалась методика Кабат, в случае CDR1 также отмечены границы участка в определении AbM, комбинации правил Кабат и Хотиа [244], которое лучше соответствует расположению петли в структуре антитела. Высокое разрешение полученных рентгеновских данных и качество карт электронной плотности позволили построить точные атомарные пространственные модели паратопа связывания антитела. Затем конформации гипервариабельных участков были изучены для определения того, относятся ли они к уже известным типам канонических структур CDR. Для этого использовалась база данных *PyIgClassify* [245], содержащая наиболее полную информацию о структурах CDR известных антител, и позволяющая проводить их классификацию. По данным анализа, гипервариабельные участки CDR1 и CDR2 антитела BCD090-M2 относятся к двум распространенным кластерам структур, называемым H1-13-1 и H2-10-2 соответственно. Напротив, полученная структура CDR3 не относится ни к одной из известных канонических конформаций. Таким образом можно заключить, что паратоп связывания антитела BCD090-M2 оказывается за пределами изученного структурного репертуара антител. Данный результат демонстрирует возможность получения уникальных антител из верблюдовых, обладающих новыми структурными характеристиками и механизмами связывания. В случае BCD090-M2, структура CDR3 вероятно не похожа на известные CDR из-за существенной длины (18 остатков), наличия пролина в нестандартной цис- конформации и сразу четырех ароматических остатков, способных обеспечивать сильное гидрофобное или  $\pi$ - $\pi$  взаимодействие на интерфейсе с эпитопом.

Структура димера антитела BCD090-M2, кристаллизованного с ионами кадмия в пространственной группе P1, представлена на рисунке 21. Ионы кадмия обладают сильным аномальным рентгеновским рассеянием при длине волны  $\text{CuK}\alpha$  (1.54 Å), которое может быть использовано для расчета фаз рентгеновских рефлексов с использованием метода одноволновой аномальной дифракции (SAD, single-wavelength anomalous diffraction). В рамках данного исследования продемонстрировано, что метод Cd-SAD может быть эффективно применен для решения структур белков при использовании лабораторных источников излучения с фиксированной длиной волны  $\text{CuK}\alpha$  [246]. При этом структуры антитела BCD090-M2, полученные методами молекулярного замещения [243] и Cd-SAD [246], практически идентичны.

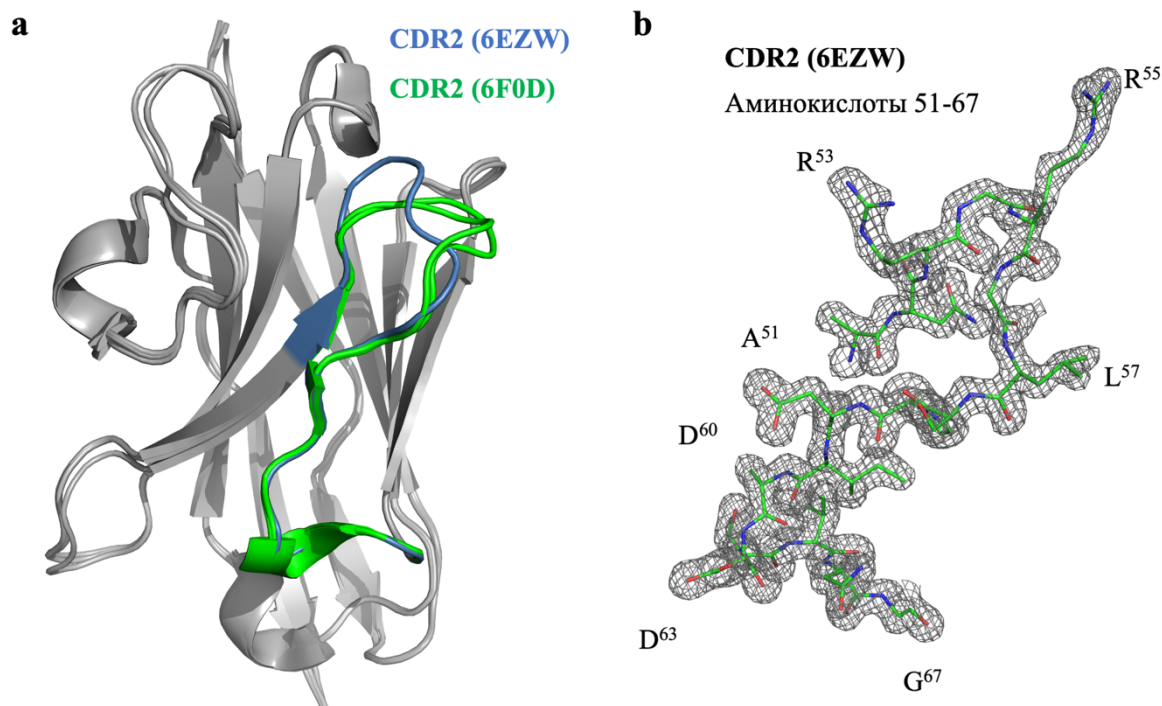
На рисунке 21а показано как два иона кадмия обеспечивают контакт между молекулами антител в соседних элементарных ячейках, тем самым стабилизируя кристалл. Данная структура согласуется с предыдущими наблюдениями того, как ионы кадмия могут индуцировать нуклеацию кристаллов белков [247]. Каждый ион  $\text{Cd}^{2+}$  формирует хелатный комплекс с двумя карбоксильными группами остатков Asp<sub>100</sub> и Asp<sub>116</sub> и кислородом карбонильной группы Glu<sub>114</sub> в

петле CDR3 одного антитела, а также карбонильным кислородом N-концевого остатка глицина молекулы антитела из соседней элементарной ячейки. Геометрия хелатного комплекса с тремя остатками в CDR3 изображена на рисунке 21b. Молекулы антитела внутри одной элементарной ячейки формируют контакт преимущественно через петли CDR3 (рисунок 21c).



**Рисунок 21** — Кристаллическая структура димера антитела BCD090-M2, полученная в пространственной группе  $P1$  с разрешением  $1.9 \text{ \AA}$  (PDB:6F0D). (a) Схематичное изображение упаковки антител в кристалле. Ионы  $\text{Cd}^{2+}$  (синим) формируют контакты между молекулами в соседних ячейках. (b) Хелатный комплекс  $\text{Cd}^{2+}$  с тремя остатками в петле CDR3. (c) Схематичное изображение структуры димера BCD090-M2 в кристалле. Контакт между молекулами формируется преимущественно за счет CDR3. Иллюстрации цитируются по опубликованным в рамках исследования статьям [243] и [246].

После получения трех независимых кристаллических структур антитела BCD090-M2 — одной молекулы в 6EZW и двух различных молекул в 6F0D — было проведено их сравнение для анализа структурной вариативности паратопа. Для этого проведено пространственное выравнивание трех структур по C<sup>α</sup> атомам каркасных областей, результаты которого приведены на рисунке 22а.



**Рисунок 22** — Сравнение полученных структур антитела BCD090-M2. **(а)** Структурное выравнивание трех полученных моделей, одной молекулы 6EZW и двух молекул 6F0D. Модели имеют практически идентичные каркасные области, CDR1 и CDR3. Различия сосредоточены в петле CDR2. **(б)** Анализ качества карт электронной плотности на примере CDR2 (остатки 51–67) в структуре 6EZW. Рисунок приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [243].

Структура каркасных областей антител имеет очень низкую вариативность, и среднее квадратичное отклонение (RMSD) атомов C<sup>α</sup> в моделях 6EZW и 6F0D составляет всего 0.19 Å. Конформационная подвижность короткой петли CDR1 также практически отсутствует, и RMSD между 6EZW и 6F0D составляет 0.28 и 0.31 Å для молекул А и В в 6F0D, соответственно. Удивительно, но наиболее сложный гипервариабельный участок CDR3 имеет жесткую конформацию, которая практически не отличается в полученных моделях. Так, RMSD атомов C<sup>α</sup> для петли CDR3 между структурами 6EZW и 6F0D составляет 0.61 Å (молекула А) и 0.57 Å (молекула В). Связывание иона кадмия и формирование межмолекулярного контакта в кристалле практически не влияют на структуру CDR3, из чего можно заключить что данный участок

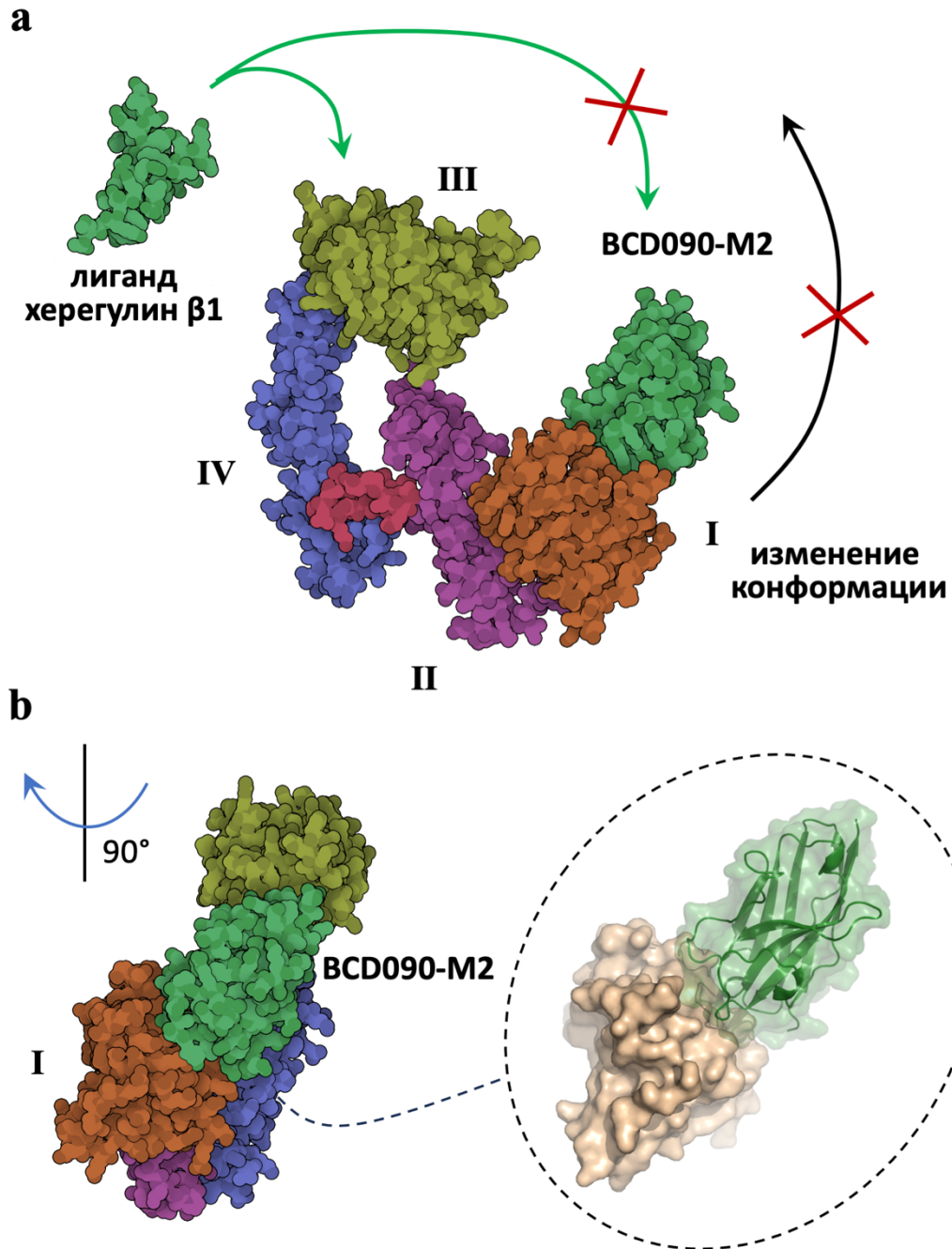
формирует жесткий, конформационно стабильный паратоп. Наибольшие структурные вариации были выявлены в участке CDR2 (рисунок 22а). Значение RMSD между 6EZW и 6F0D для атомов C<sup>α</sup> составило 1.81 Å и 1.77 Å для молекул А и В соответственно, и наибольшие различия наблюдались в участке Arg<sub>53</sub>–Leu<sub>57</sub>. Несмотря на вероятную подвижность этой петли, в обоих кристаллах она была хорошо упорядочена. Карта электронной плотности, приведенная на рисунке 22b, демонстрирует что все аминокислотные остатки в CDR2 и даже их боковые цепи могут быть достоверно определены. Вероятно, такая подвижность CDR2 в BCD090-M2 связана с наличием неконсервативного пролина в позиции 60. Ограничения доступных конформаций для пролина могут создавать напряжения в этой области белка, что влечет нестабильность конформации CDR2 и, вероятно, сказывается на общей термодинамической стабильности данного однодоменного антитела, которая оказывается ниже, чем у BCD090-P1 и BCD090-M456. Полученные структурные и термодинамические данные позволяют выявить пути рациональной инженерии однодоменного антитела BCD090-M2 для дальнейшей оптимизации его характеристик.

### 3.4.2 Моделирование комплекса однодоменного антитела BCD090-M2 с эктодоменом рецептора ErbB3

Вслед за расшифровкой пространственной структуры антитела BCD090-M2 было проведено молекулярное моделирование его комплекса с эктодоменом ErbB3 для идентификации эпитопа на рецепторе. Полученные структуры высокого разрешения для BCD090-M2 и наличие сразу нескольких структур эктодомена ErbB3 в базе данных PDB позволяют задействовать классические методы молекулярного докинга. Однако в данном исследовании был избран другой подход и применены недавно разработанные функции программы *AlphaFold 2* для моделирования мультимеров белков. *AlphaFold 2* использует методы машинного обучения и базу структур PDB в качестве тренировочной выборки для распознавания паттернов в аминокислотных последовательностях белков и построения их структурных моделей *de novo*. На сегодняшний день *AlphaFold 2* является самым точным вычислительным методом для предсказания пространственных структур белков, и полученные с ее помощью модели сравнимы по качеству с экспериментальными данными [213]. Недавно было замечено, что несмотря на то, что оригинальный метод был разработан для фолдинга одиночных белков, *AlphaFold 2* также позволяет эффективно осуществлять докинг белков и пептидов [248]. Данные функции были развиты в модели *AlphaFold Multimer* [214], которая является наиболее мощным инструментом моделирования белковых комплексов и превосходит по эффективности даже самые развитые методы классического докинга [249]. Модель комплекса однодоменного антитела BCD090-M2 с



эктодоменом рецептора ErbB3 была построена при помощи программы *AlphaFold Multimer*, имплементированной в *ColabFold* [215]. Модель с наивысшим качеством (скоринг  $pLDDT = 0.91$ ,  $pTM = 0.79$ ) представлена на рисунке 23.



**Рисунок 23** — Модель связывания однодоменного антитела BCD090-M2 с эктодоменом рецептора ErbB3. **(а)** Результат моделирования комплекса BCD090-M2 с эктодоменом ErbB3 в *AlphaFold 2*. Антитело связывается с субдоменом I, предполагаемый эпитоп перекрывается с сайтом связывания херегулина  $\beta 1$  и лумретузумаба. **(б)** Вид того же комплекса при повороте на 90°. Интерфейс связывания определяется в основном CDR2 и CDR3.

В результате моделирования было установлено, что наиболее вероятный эпитоп BCD090-M2 расположен на субдомене I эктодомена ErbB3. Как и предполагалось, в полученной модели контакт с антигеном в основном формируется петлями CDR2 и CDR3 антитела (рисунок 23b). При этом эпитоп BCD090-M2 на субдомене I перекрывается как с сайтом связывания естественного лиганда ErbB3 херегулина  $\beta 1$ , так и с эпитопом другого антитела к рецептору, лумретузамаба. На основе полученной модели можно предположить, что взаимодействие однодоменного антитела BCD090-M2 с рецептором может блокировать присоединение лиганда и необходимый для активации конформационный переход, аналогично тому как показано для лумретузамаба [37]. Качество построенной в *AlphaFold* модели было дополнительно оценено путем структурного выравнивания молекулы BCD090-M2 из комплекса и экспериментально полученных структур BCD090-M2. Среднее квадратичное отклонение (RMSD) атомов  $C^\alpha$  между BCD090-M2 в модели комплекса и экспериментальной структурой 6EZW составляет всего 0.49 Å с учетом всех участков CDR, что демонстрирует точность предсказаний *AlphaFold*.

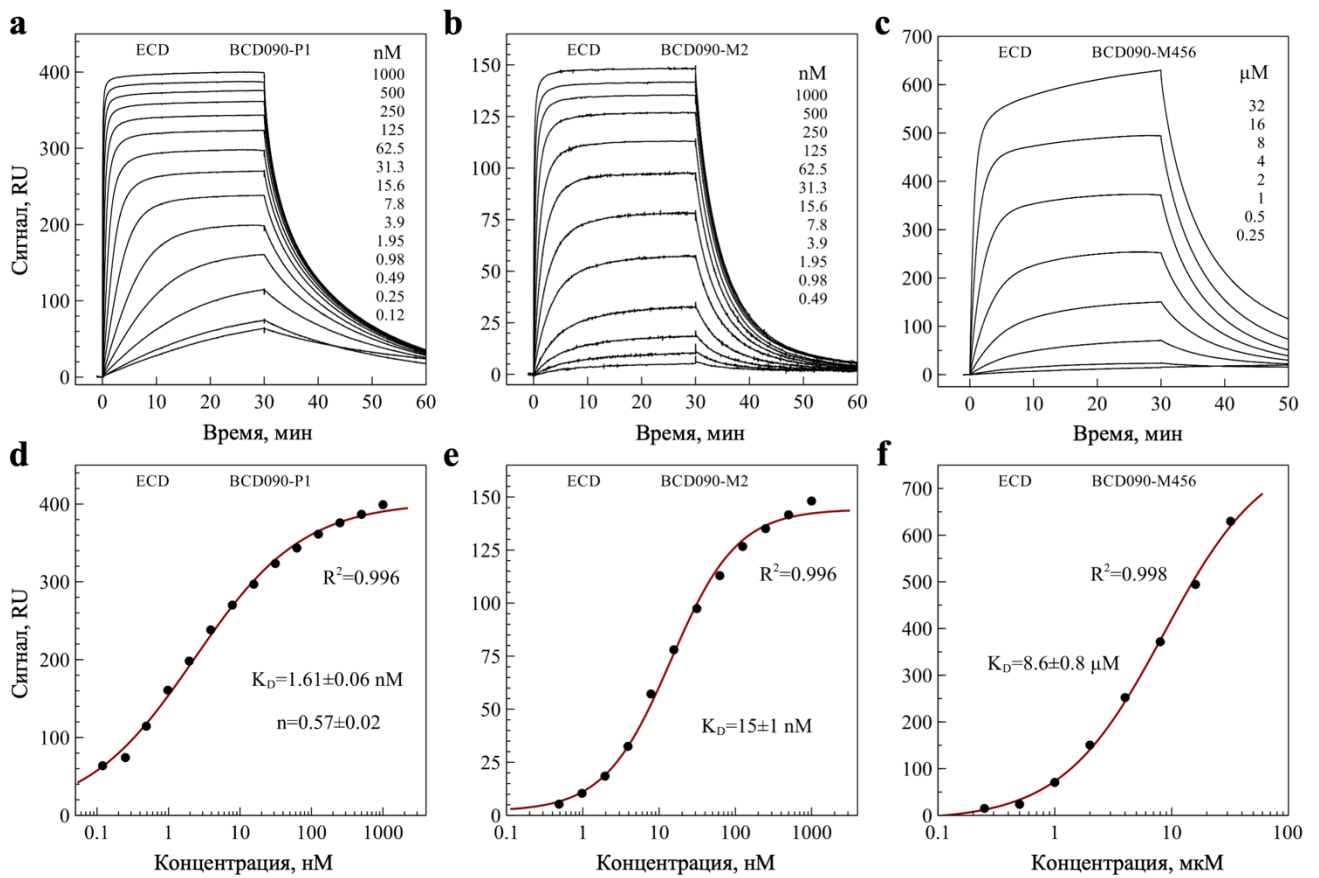
Резюмируя результаты структурных исследований BCD090-M2, можно заключить, что полученные данные позволили детально изучить структуру паратопа однодоменного антитела и механизмы молекулярного распознавания антигена. Полученные в разных условиях экспериментальные структуры антитела показывают те участки, где наблюдается структурная вариативность, и позволяют выявить позиции, рациональная инженерия которых может быть применена для улучшения характеристик антитела. Наконец, идентификация эпитопа BCD090-M2 на рецепторе позволяет предположить молекулярный механизм его действия, основанный на конкуренции с лигандом ErbB3.

### **3.5 Взаимодействие однодоменных антител с рецептором ErbB3**

#### **3.5.1 Однодоменные антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 связываются с эктодоменом ErbB3 с высокой аффинностью**

Взаимодействие антител с эктодоменом рецептора ErbB3 было детально изучено при помощи метода поверхностного плазмонного резонанса. Во всех экспериментах рецептор иммобилизован на сенсорном чипе, а растворы антител различной концентрации инжестрировались на его поверхность посредством специальной микрофлюидной системы. Сенсограммы, т. е. кривые изменения поверхностной концентрации белка, регистрировались в резонансных единицах (RU) и использовались для дальнейшего кинетического и равновесного анализа. Репрезентативные серии измеренных сенсограмм представлены на рисунках 24а-с. Аналогичный эксперимент проведен с иммобилизованным эктодоменом HER2, в результате

чего подтверждено полное отсутствие кросс-реактивности антител с HER2. Для равновесного анализа были построены кривые связывания, т. е. графики максимального сигнала связывания антитела в зависимости от его концентрации. Для определения равновесных констант диссоциации  $K_D$  проведена аппроксимация кривых связывания уравнением Хилла, результаты которой приведены на рисунках 24d-f. Два наиболее перспективных антитела, BCD090-P1 и BCD090-M2, имеют равновесные константы диссоциации в наномолярном диапазоне, тогда как BCD090-M456 обладает более низкой аффинностью. Экспериментальные данные хорошо описываются моделью с  $R^2 > 0.99$ .



**Рисунок 24** — Взаимодействие однодоменных антител с эктодоменом ErbB3. (a) Серия кривых ассоциации и диссоциации антитела BCD090-P1 с иммобилизованным рецептором, полученная методом поверхностного плазмонного резонанса. (b) То же для антитела BCD090-M2. (c) То же для антитела BCD090-M456. (d) Равновесная кривая связывания антитела BCD090-P1 и результат ее аппроксимации уравнением Хилла. (e) и (d) Аналогичный анализ для антител BCD090-M2 и BCD090-M456. Антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 взаимодействуют с ErbB3 с наномолярной аффинностью. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225].

Эти же экспериментальные сенсограммы были использованы для кинетического анализа, при помощи которого определены константы скоростей ассоциации и диссоциации  $k_a$  и  $k_d$ , а также проведено дополнительное измерение значения равновесной константы диссоциации  $K_D$ . Все полученные значения приведены в таблице 11.

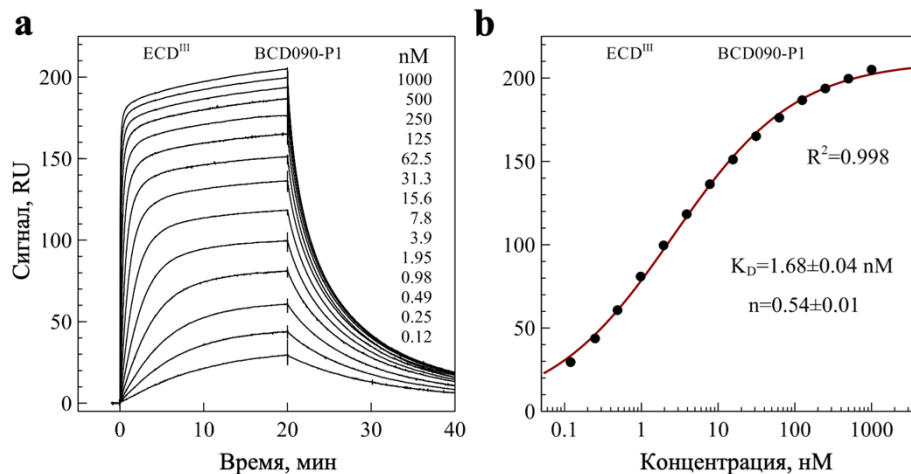
**Таблица 11** — Константы скоростей ассоциации и диссоциации а также равновесные константы диссоциации  $K_D$ , полученные в результате анализа данных поверхностного плазмонного резонанса. Приведены средние значения 3-х экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение.

	$k_a \cdot 10^{-5}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_d \cdot 10^3, \text{c}^{-1}$	$K_D, \text{нМ}$ из кинетики	$K_D, \text{нМ}$ из равновесия
BСD090-Р1	$19 \pm 4$	$3.0 \pm 1.0$	$1.6 \pm 0.2$	$1.61 \pm 0.06$
BСD090-М2	$2.2 \pm 0.4$	$3.6 \pm 0.1$	$16.5 \pm 2.0$	$15 \pm 1$
BСD090-М456	$0.0072 \pm 0.0002$	$2.2 \pm 0.2$	$3100 \pm 200$	$8600 \pm 800$
peIB-BСD090-Р1-His <sub>5</sub>	$8.7 \pm 2.0$	$4.4 \pm 0.2$	$5.1 \pm 0.9$	$6.5 \pm 0.9$

Как видно из таблицы, кинетический и равновесный анализ связывания дают замечательно согласованные значения аффинности антител к рецептору ErbВ3. Антитело BСD090-Р1 взаимодействует с рецептором наиболее сильно, и его аффинность немного уменьшается (в 4 раза) при наличии N-концевого пептида peIB. Антитело BСD090-М2 также имеет наномолярную равновесную константу диссоциации. Несмотря на то, что антитело BСD090-М456 имеет наименьшую аффинность среди изученных молекул, оно формирует наиболее стабильный комплекс с рецептором, характеризующийся самой медленной диссоциацией. Разница в три порядка в равновесной константе диссоциации по сравнению с другими антителами обусловлена исключительно низкой константой скорости ассоциации BСD090-М456 с рецептором. Медленная ассоциация может быть следствием низкой представленности определенной конформации, необходимой для связывания (механизм конформационной селекции), или медленной структурной изомеризации (механизм индуцированного соответствия). Экспериментальные данные не позволяют достоверно различить эти два потенциальных механизма. Предположительно, молекулярной основой такой необычной кинетики взаимодействия является отсутствие консервативной дисульфидной связи, что вместе с длинной петлей CDR3 (23 аминокислоты) существенно увеличивает количество степеней свободы и конформационное разнообразие паратопа данного антитела.

### 3.5.2 BCD090-P1 и BCD090-M2 взаимодействуют с разными эпитопами

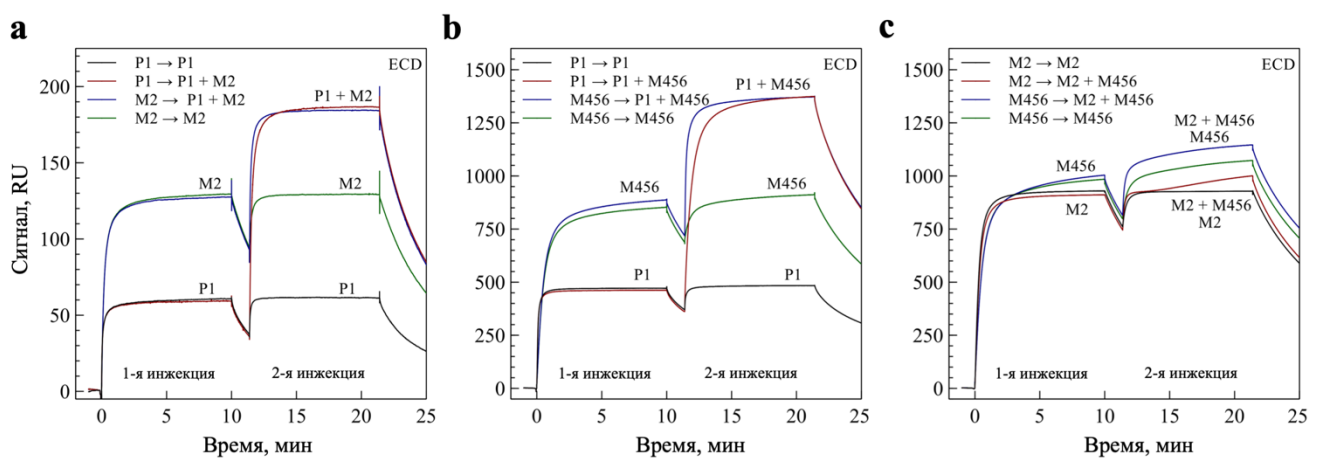
Вслед за изучением кинетики и аффинности связывания каждого однодоменного антитела с рецептором были проведены серии различных экспериментов для идентификации их эпитопов на эктодомене ErbB3. В первую очередь было исследовано взаимодействие антител с субдоменом III, так как именно он считался наиболее перспективным эпитопом и использовался для бустерной иммунизации животных. Экспериментальные сенсограммы связывания BCD090-P1 с иммобилизованным ECD<sup>III</sup> приведены на рисунке 25а. Антитело BCD090-P1 взаимодействовало с изолированным субдоменом III с аффинностью, идентичной измеренной для полноразмерного эктодомена, и равной 1.6 нМ (рисунок 25b). Таким образом можно заключить, что для данного антитела сработала задуманная стратегия иммунизации, и была получена молекула, распознающая именно заданный участок ErbB3. Два других антитела не взаимодействовали с субдоменом III. Вероятно, их меньшая по сравнению с BCD090-P1 аффинность к рецептору объясняется тем, что данные клоны не были повторно стимулированы антигеном и соответственно не прошли дополнительного этапа созревания аффинности.



**Рисунок 25** — Анализ взаимодействия антитела BCD090-P1 с субдоменом III рецептора ErbB3. (a) Серия кривых ассоциации и диссоциации при различных концентрациях антитела. (b) Равновесная кривая связывания и результат ее аппроксимации уравнением Хилла. Аффинность антитела к ECD<sup>III</sup> практически идентична его аффинности к полноразмерному эктодомену.

Дальнейшее исследование эпитопов антител и их потенциальных перекрытий между собой проводилось путем экспериментов по парному связыванию антител с полноразмерным эктодоменом ErbB3. В этих экспериментах сначала проводилась длительная инъекция одной молекулы в высокой концентрации для насыщения всех доступных сайтов связывания (1-я инъекция). Затем на чип инжестировалась смесь двух молекул для изучения того, будет ли

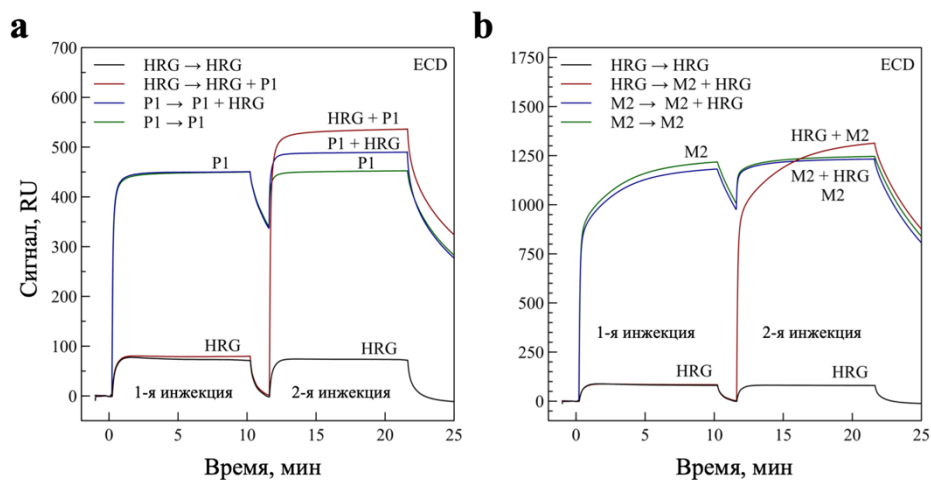
происходить связывание с рецептором второй молекулы в присутствии первой (2-я инъекция). Эксперименты проводились при разном порядке инъектирования антител, что позволило определить, зависит ли их связывание от «предыстории» взаимодействия рецептора. Как видно из рисунков 26а-б, связывание антитела BCD090-P1 происходит независимо от BCD090-M2 и BCD090-M456, и в присутствии двух антител формируется тройной комплекс. Данный эксперимент демонстрирует, что эпитоп BCD090-P1 не пересекается с эпитопами двух других антител. Напротив, антитела BCD090-M2 и BCD090-M456 полностью блокируют связывание друг друга (рисунок 26с), из чего можно заключить, что они взаимодействуют с перекрывающимися эпитопами.



**Рисунок 26** — Изучение эпитопов связывания антител. **(а)** Антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 одновременно и независимо друг от друга связываются с эктодоменом ErbB3, что свидетельствует о различии их эпитопов. **(б)** То же самое наблюдается для пары BCD090-P1 и BCD090-M456. **(с)** Антитела BCD090-M2 и BCD090-M456 блокируют связывание друг друга и, следовательно, имеют пересекающиеся эпитопы. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225].

Эксперименты аналогичного дизайна проведены для изучения того, блокируют ли антитела связывание лиганда. В одиночку, херегулин  $\beta 1$  связывался с эктодоменом ErbB3 с наномолярной аффинностью, при этом сигнал связывания (около 80 RU) был меньше, чем для однодоменных антител, из-за малой молекулярной массы лиганда. Как видно из рисунка 27а, инъекция антитела BCD090-P1 после насыщения рецептора лигандом приводила к формированию тройного комплекса. Как и ожидалось, сигнал поверхностного плазмонного резонанса для тройного комплекса был равен сумме сигналов связывания для лиганда и антитела. Таким образом, ассоциация лиганда с рецептором не препятствовала последующему связыванию антитела BCD090-P1.

Удивительно, но при смене порядка взаимодействия наблюдался иной процесс. После насыщения ErbB3 антителом BCD090-P1, херегулин  $\beta 1$  также связывался с эктодоменом, но изменение сигнала связывания ( $\sim 40$  RU) было в 2 раза меньше, чем для херегулина без антитела ( $\sim 80$  RU). Таким образом, взаимодействие в исследуемой системе зависело от «предыстории» рецептора. Поскольку сигнал связывания пропорционален поверхностной концентрации белка, можно заключить, что в реализуемых условиях к рецепторам на чипе присоединялось в два раза меньше молекул лиганда. Аналогичные рассуждения относятся и к антителу BCD090-P1. Из сравнения сигналов связывания различных антител на сенсограммах на рисунке 26a-b можно заметить, что присоединение BCD090-P1 ведет к двукратно меньшему увеличению сигнала, чем в случае двух других антител. Можно предположить, что в условиях эксперимента молекулы эктодомена ErbB3, иммобилизованные на гибком основании из молекул декстрана, могут образовывать димеры, структурно напоминающие димеры рецептора на поверхности клеток. В таком случае, интерпретацией экспериментальных данных может быть такой процесс, при котором присоединение одной молекулы BCD090-P1 аллостерически индуцирует определенную конформацию димера, делающую невозможным связывание второй молекулы антитела либо лиганда.



**Рисунок 27** — Изучение конкуренции однодоменных антител с лигандом ErbB3. **(а)** Антитело BCD090-P1 не конкурирует напрямую с херегулином  $\beta 1$  (HRG). При этом, если рецептор был сначала инкубирован с BCD090-P1, связывание лиганда уменьшается в 2 раза, что предполагает аллостерическое взаимодействие сайтов связывания антитела и лиганда. **(б)** Антитело BCD090-M2 напрямую конкурирует с херегулином  $\beta 1$  и полностью блокирует его связывание. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225].

В случае антитела BCD090-M2 наблюдалось полное ингибирование связывания лиганда, независимо от порядка взаимодействия белков (рисунок 27с). Таким образом, антитело BCD090-M2 конкурирует с естественным лигандом рецептора и не конкурирует с антителом BCD090-P1,



связывающимся с субдоменом III. Поскольку херегулин  $\beta 1$  взаимодействует с субдоменами I и III, а антитело BCD090-M2 не взаимодействует с изолированным субдоменом III, можно заключить что эпитоп BCD090-M2 расположен на субдомене I. Данный результат экспериментов по изучению взаимодействия методом поверхностного плазмонного резонанса согласуется с результатами моделирования комплекса BCD090-M2 и эктодомена ErbB3 в *AlphaFold 2*. Эпитоп и механизм взаимодействия с рецептором для антитела BCD090-M2 вероятно наиболее близки к лумретузумабу.

Подводя итог экспериментам по изучению взаимодействия однодоменных антител с изолированным рецептором ErbB3, можно заключить, что наиболее перспективные антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 связываются с различными эпитопами на субдоменах I и III эктодомена рецептора и различными путями интерферируют с механизмом его активации. Антитело BCD090-M2 напрямую блокирует связывание лиганда рецептора ErbB3, аналогично терапевтическому антителу лумретузумабу. Антитело BCD090-P1 не конкурирует с лигандом за связывание с рецептором напрямую, но вероятно индуцирует определенную конформацию ErbB3 или его димера, препятствующую развитию процесса активации по стандартному пути.

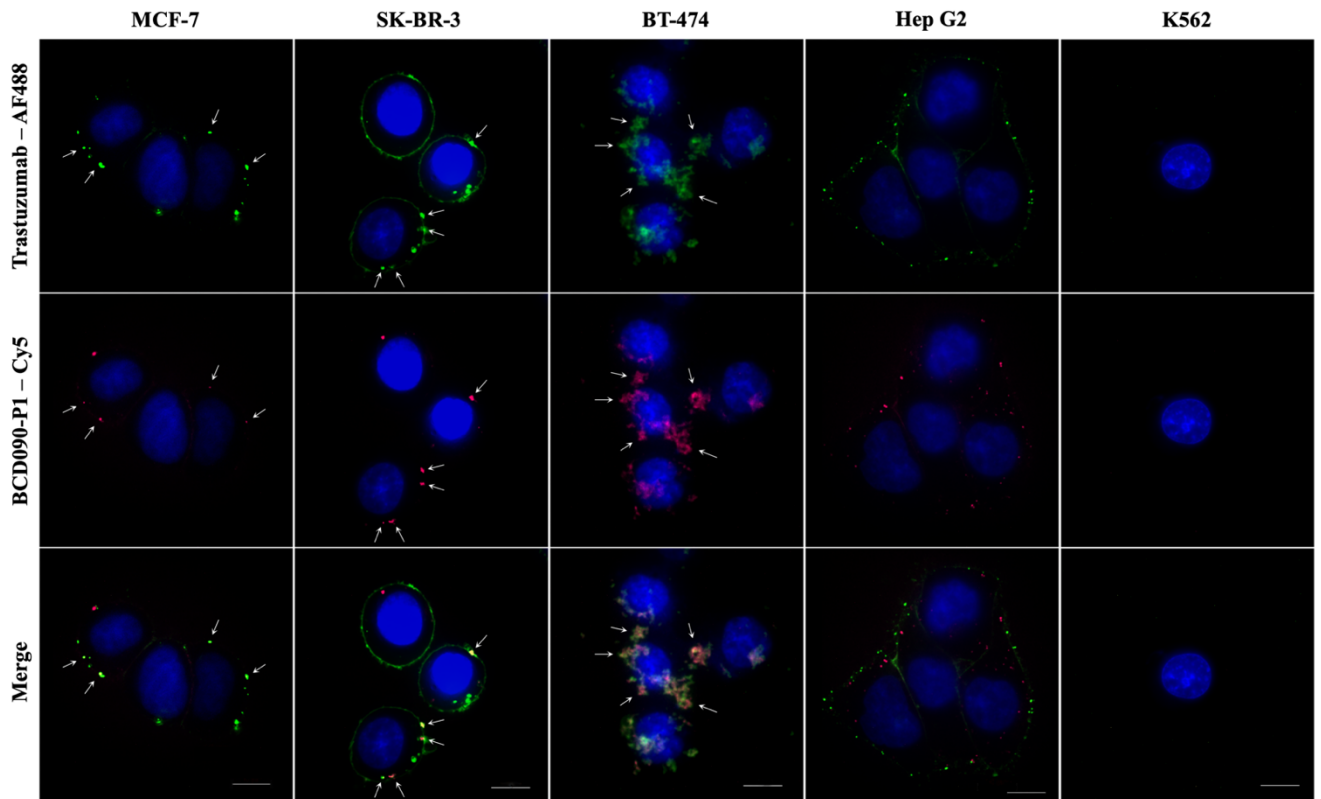
### **3.5.3 Однодоменные антитела связываются с рецептором на опухолевых клетках и ко-локализуются с HER2 и ErbB3**

Визуализация связывания антител с рецептором ErbB3 на опухолевых клетках и изучение пространственной локализации комплексов антитело-рецептор были проведены при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии. Для этого несколько клеточных линий рака молочной железы с экспрессией рецепторов HER2 и ErbB3, а также клетки гепатоцеллюлярной аденокарциномы Нер G2 и хронического миелоидного лейкоза K562, были окрашены при помощи антител с флуоресцентными метками. Не-эпителиальные клетки K562 без экспрессии рецепторов ErbB3 использовались в качестве отрицательного контроля. Прямое конъюгирование антител BCD090-P1, BCD090-M2 и трастузумаба с красителями Cy5 и AF488 позволило получить яркие меченые антитела с 2 (однодоменные антитела) и 7 (трастузумаб) молекулами флуоресцентной метки на белок соответственно.

Репрезентативные конфокальные снимки для антитела BCD090-P1 приведены на рисунке 28, аналогичные результаты были получены для BCD090-M2. Иммуноцитохимическое окрашивание опухолевых клеток при помощи однодоменных антител выявило паттерн из одиночных ярких точек, характерный для всех экспрессирующих ErbB3 клеточных линий. Аналогичный паттерн наблюдался при окрашивании клеток трастузумабом. В некоторых клетках, особенно для линии SK-BR-3, распределение рецепторов было таким неравномерным, что все комплексы антитело-



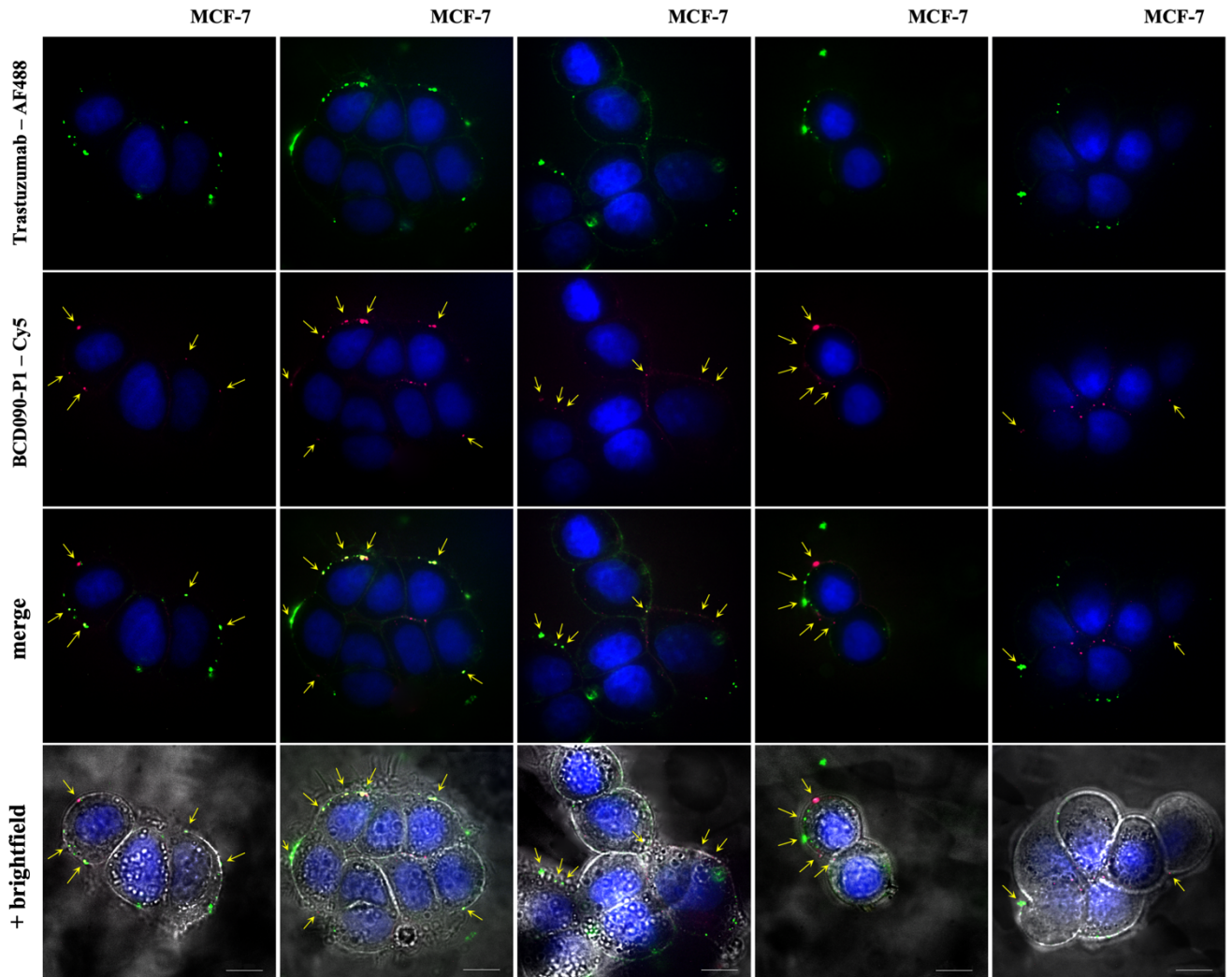
рецептор аккумулировались в единственной зоне с высокой интенсивностью флуоресценции. В случае клеток K562 существенного окрашивания не наблюдалось, что свидетельствует о специфичности взаимодействия антител с рецептором ErbB3.



**Рисунок 28** — Конфокальная микроскопия после иммуноцитохимического окрашивания различных раковых клеточных линий антителом BCD090-P1 и трастузумабом. Снимки с BCD090-P1 и трастузумабом имеют похожие паттерны окрашивания, большинство рецепторов сосредоточены в небольших кластерах преимущественно на клеточной мембране и частично во внутриклеточных везикулах. Не-эпителиальные клетки K562, не имеющие рецепторов ErbB, использованы в качестве отрицательного контроля. Рецепторы HER2 и ErbB3 демонстрируют высокую степень ко-локализации в клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7, SK-BR-3 и BT-474, но не в гепатоцеллюлярной карциноме Hep G2. Стрелки указывают на области ко-локализации HER2 и ErbB3. Шкала 10 мкм. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225].

Общий характер распределения комплексов антитело-рецептор в проведенных экспериментах имеет сходство с ранее опубликованными данными для иммуноцитохимического окрашивания клеток рака молочной железы при помощи флуоресцентно меченых аффител к рецептору ErbB3 [171]. При этом, в отличие от упомянутой работы, в настоящем исследовании был разработан протокол микроскопии с использованием живых клеток без фиксации и

пермеабиллизации, что позволяет изучать транспорт комплексов в мембране и интернализацию рецепторов под действием антител.



**Рисунок 29** — Конфокальная микроскопия после иммуноцитохимического окрашивания клеток MCF-7 антителом BCD090-P1 и трастузумабом. Стрелками отмечены области, где оба антитела ко-локализуются на клеточной мембране. Флуоресцентные снимки наложены на снимки в светлом поле для лучшей визуализации мембран. Шкала 10 мкм.

Предполагается, что большая часть комплексов антитело-рецептор локализованы на клеточной мембране. Особенно хорошо мембранную локализацию рецепторов видно в экспериментах на клетках MCF-7 при суперпозиции флуоресцентных снимков и обычных снимков в светлом поле, как показано на рисунке 29. Однако, некоторая доля рецепторов с антителами находится во внутриклеточных везикулах, что особенно хорошо заметно при внимательном рассмотрении снимков для Her G2 на рисунке 28. Так, некоторые комплексы ErbB3 с BCD090-P1 (красным цветом) находятся ближе к клеточному ядру, чем расположенные на мембране комплексы HER2-трастузумаб (зеленым цветом). Поскольку клетки не были

пермеабиллизированы и представленная фокальная плоскость проходит через середину клетки, не затрагивая базальные и апикальные поверхности, можно заключить что рецепторы подверглись эндоцитозу после взаимодействия с антителом. Остается неясным, является ли этот процесс интернализации спонтанным, или связывания антитела с рецептором ErbB3 стимулирует его эндоцитоз.

Рецепторы HER2 и ErbB3 демонстрируют замечательную ко-локализацию в трех линиях аденокарциномы молочной железы, MCF-7, SK-BR-3 и BT-474. Соответствующие кластерам рецепторов яркие точки зачастую прекрасно накладываются друг на друга в конфокальных изображениях, при этом окрашивание в BT-474 несколько более диффузное. Напротив, в клетках Her G2, несмотря на то, что рецепторы HER2 и ErbB3 также формируют одиночные яркие точки, они не демонстрируют существенной ко-локализации. Различия в распределении рецепторов, вероятно, отражают их функциональные роли. Так, в клетках рака молочной железы сигнализация через HER2 и ErbB3 функционально значима и является драйвером пролиферации. В отличие от рака молочной железы, в гепатоцеллюлярной карциноме и, соответственно, клетках Her G2, рецепторы эпидермального фактора роста не имеют существенной патофизиологической роли. Представленные результаты демонстрируют эффективное специфическое связывание однодоменных антител с рецептором ErbB3 на клетках рака молочной железы и визуализируют наличие пространственно изолированных «кластеров онкогенной сигнализации», как их назвали Holbro и соавторы в классической работе [27], где происходит активация гетеродимеров HER2:ErbB3.

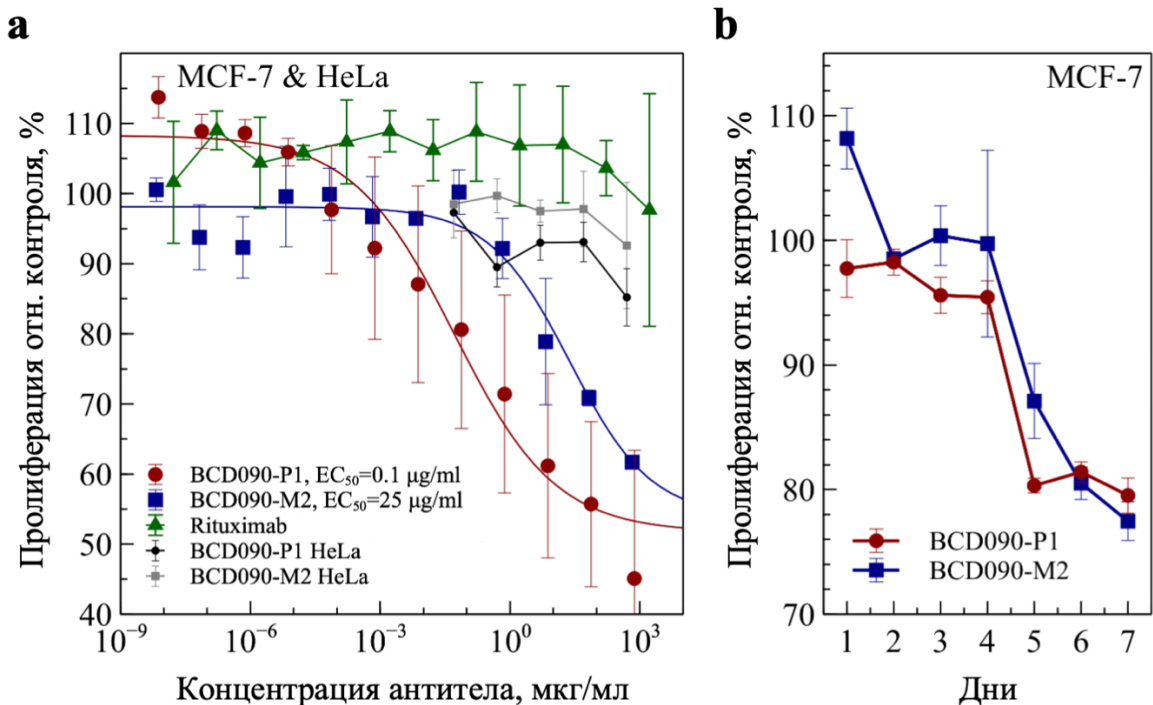
### **3.6 Антипролиферативное действие однодоменных антител**

#### **3.6.1 Однодоменные антитела подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию клеток рака молочной железы MCF-7**

Главным функциональным эффектом направленного блокирования активации рецептора ErbB3 является замедление пролиферации и снижение выживаемости раковых клеток. Антипролиферативное действие однодоменных антител было изучено с использованием двух классических клеточных моделей: клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3. Клеточная линия MCF-7 является наиболее часто используемой моделью для изучения рака молочной железы и в фенотипической классификации опухолей относится к люминальному типу А [250]. Данная линия уникальна своей универсальностью в отношении тех опухолевых процессов, которые можно изучать с ее помощью. С одной стороны, клетки MCF-7 характеризуются экспрессией рецептора эстрогена, что позволяет использовать их как модель гормонально-чувствительных опухолей. С другой стороны, линия MCF-7 является классической

моделью для исследования функциональных ролей рецепторов ErbB. Данные клетки не имеют амплификации гена рецептора HER2, но при этом характеризуются существенным уровнем экспрессии HER2 и высоким уровнем ErbB3 [251]. Сигнализация в гетеродимерах HER2:ErbB3 была открыта именно в клетках MCF-7 [26]. При этом активация гетеродимеров стимулируется не гиперэкспрессией HER2, как происходит в HER2<sup>+</sup> типе рака молочной железы, а естественным лигандом ErbB3, херегулином.

Для изучения подавления пролиферации клеток MCF-7 были проведены эксперименты по культивации клеток с различными концентрациями однодоменных антител. Полученные кривые доза-эффект и их аппроксимации уравнением Хилла для определения эффективной концентрации  $EC_{50}$  приведены на рисунке 30а.



**Рисунок 30** — Подавление ErbB3-зависимой пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7. **(а)** Кривые подавления пролиферации различными концентрациями однодоменных антител BCD090-P1 и BCD090-M2. Клетки HeLa (HER2<sup>-</sup>, ErbB3<sup>-</sup>) и антитело к CD20 ритуксимаб использованы в качестве отрицательных контролей. Экспериментальные данные аппроксимированы уравнением Хилла для определения  $EC_{50}$ . **(б)** Кривые роста клеток MCF-7 в присутствии антител в концентрации 50 мкг/мл. Оба антитела вызывают длительное снижение пролиферации опухолевых клеток. Представлены средние значения для 3 экспериментов, погрешность на графиках соответствует стандартному отклонению. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225].

Поскольку клетки MCF-7 являются гормонально-чувствительными, во всех экспериментах использовалась среда без фенолового красного, который является агонистом рецептора эстрогена [252], а сыворотка предварительно обрабатывалась активированным углем для удаления стероидных гормонов [219]. Таким образом, гормональный путь активации пролиферации был подавлен, и рост клеток стимулировался исключительно херегулином через активацию ErbB3 в гетеродимерах HER2:ErbB3.

Как видно из рисунка 30а, оба антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 подавляли стимулированную херегулином ErbB3-зависимую пролиферацию клеток MCF-7 с эффективными концентрациями  $EC_{50}$ , равными 0.1 мкг/мл и 25 мкг/мл, соответственно. При этом добавление однодоменных антител не оказывало существенного воздействия на рост клеток HeLa, не экспрессирующих рецепторы HER2 и ErbB3, что исключает неспецифическую токсичность антител. Использованное в качестве отрицательного контроля антитело к несвязанному с семейством ErbB рецептору CD20 (ритуксимаб) также не влияло на пролиферацию MCF-7. Полученные результаты демонстрируют, что исследуемые однодоменные антитела специфически подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию опухолевых клеток и не обладают несвязанной с ErbB прямой цитотоксичностью.

Более высокая активность BCD090-P1 по сравнению с BCD090-M2 может быть частично объяснена большей аффинностью данного антитела. Другим фактором, определяющим способность антител подавлять пролиферацию раковых клеток, является молекулярный механизм их действия. В то время как BCD090-M2 конкурирует с лигандом напрямую, антитело BCD090-P1 связывается с субдоменом III и, вероятно, блокирует конформационные изменения, необходимые для активации рецептора. Эпитоп и механизм действия BCD090-M2 наиболее близки к лумретузумабу [37], а аллостерическое блокирование активации посредством BCD090-P1 имеет сходство с механизмом действия антитела KTN3379, которое также связывается с субдоменом III и стабилизирует рецептор в неактивной конформации [38]. Какой из механизмов действия предпочтителен и реализует лучшие терапевтические и фармакологические характеристики *in vivo* остается неясным. Как было показано в Главе 1, несмотря на то, что разрабатываемые в настоящее время классические антитела к ErbB3 имеют различные эпитопы и механизмы действия, многие из них демонстрируют сравнимую терапевтическую эффективность. Возможно, активность однодоменных антител BCD090-P1 и BCD090-M2 и их способность блокировать ErbB сигнализацию также зависит от фенотипа опухолевых клеток, в частности от уровня экспрессии рецепторов EGFR и HER2, образующих гетеродимеры с ErbB3.

Для исследования динамики процесса подавления пролиферации был изучен рост опухолевых клеток при воздействии однодоменных антител. Антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 добавлялись в среду в концентрации 50 мкг/мл, после чего клетки культивировались в течение

недели с ежедневной оценкой пролиферации в части лунок при помощи MTS теста. Полученные 7-дневные кривые роста клеток MCF-7 представлены на рисунке 30b. Как видно из приведенных графиков, оба антитела вызвали монотонное снижение пролиферации MCF-7 относительно контроля во всем исследованном временном промежутке. Важно отметить, что при высоких по сравнению с  $EC_{50}$  концентрациях, антитела вызвали практически идентичный функциональный отклик, независимо от их эпитопа и механизма действия. Полученные данные также демонстрируют высокую стабильность однодоменных антител в клеточной культуре, поскольку эффект подавления пролиферации от добавленных в нулевой день антител не ослабевал за время 7-дневного культивирования.

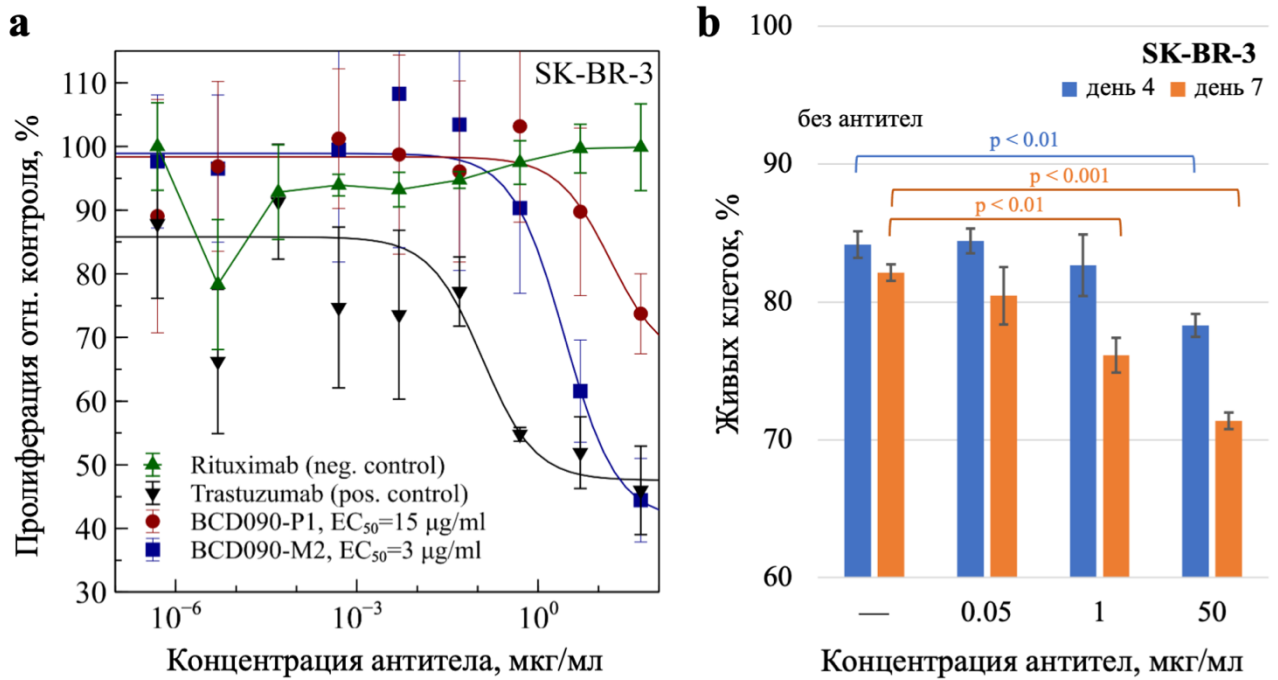
### **3.6.2 Однодоменные антитела подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию гиперэкспрессирующих рецептор HER2 клеток рака молочной железы SK-BR-3**

Аналогичные эксперименты по изучению антипролиферативного действия однодоменных антител были проведены с клетками аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, гиперэкспрессирующими рецептор HER2. Данная клеточная линия характеризуется нечувствительностью к гормонам вследствие отсутствия рецепторов эстрогена и прогестерона. При этом клетки SK-BR-3 имеют наивысший среди клеточных линий рака молочной железы уровень экспрессии HER2, более  $10^6$  рецепторов на клетку [253]. Избыток рецептора HER2 на мембране стимулирует образование гетеродимеров HER2:ErbB3 и ведет к конститутивной активации нижележащих сигнальных путей. Клетки SK-BR-3 являются классической моделью HER2-зависимых опухолей молочной железы [250].

На рисунке 31a представлены кривые подавления пролиферации для однодоменных антител BCD090-P1 и BCD090-M2, а также терапевтического анти-HER2 антитела трастузумаба, использованного в качестве положительного контроля. Оба однодоменных антитела снижают пролиферацию клеток SK-BR-3 с эффективными концентрациями  $EC_{50}$ , равными 15 мкг/мл (BCD090-P1) и 3 мкг/мл (BCD090-M2). Для сравнения, эффективная концентрация для трастузумаба составляет 0.1 мкг/мл. Большая активность трастузумаба по сравнению с BCD090-P1 и BCD090-M2 связана в первую очередь с различными мишенями данных антител и отчасти с бивалентностью полноразмерного антитела. Трастузумаб блокирует рецептор HER2, гиперэкспрессия которого является основным драйвером активации гетеродимеров ErbB в клетках SK-BR-3. Таким образом, в данной модели HER2 является первоочередной мишенью, а ErbB3 — вспомогательной. При этом блокирование рецептора ErbB3 снижает пролиферацию клеток даже без одновременного блокирования HER2, что явно демонстрирует потенциал применения однодоменных антител к ErbB3. Представленные выше результаты функциональных



экспериментов на клетках MCF-7, где экспрессия HER2 существенно ниже чем в SK-BR-3, и, соответственно, роль ErbB3 более значима, показывают что BCD090-P1 может проявлять активность, не уступающую трастузумабу, с  $EC_{50}$  равной 0.1 мкг/мл (~ 7 нМ). Будущие иммунотерапевтические подходы вероятно будут реализовывать одновременное блокирование HER2 и ErbB3 при помощи комбинаций антител или биспецифических молекул, что позволит увеличить силу и специфичность воздействия на опухолевые клетки.



**Рисунок 31** — Подавление ErbB3-зависимой пролиферации гиперэкспрессирующих HER2 клеток аденокарциномы молочной железы SK-BR-3. **(а)** Кривые подавления пролиферации различными концентрациями однодоменных антител BCD090-P1 и BCD090-M2. Ритуксимаб применен в качестве отрицательного контроля, терапевтическое антитело к HER2 трастузумаб использовано как положительный контроль. **(б)** Снижение доли живых раковых клеток при добавлении эквимольной смеси антител BCD090-P1 и BCD090-M2 по данным проточной цитофлуориметрии. Статистически значимое снижение выживаемости клеток SK-BR-3 достигается при концентрации антител 1 мкг/мл. Показаны средние значения для 3 экспериментов ( $\pm$  стандартное отклонение), значимость оценена при помощи  $t$ -теста. Иллюстрация приводится по опубликованной в рамках данного исследования работе [225].

Жизнеспособность раковых клеток при культивации в присутствии однодоменных антител была оценена при помощи проточной цитофлуориметрии после окрашивания мертвых клеток иодистым пропидием. В день 0 к клеткам добавлялась эквимольная смесь однодоменных антител BCD090-P1 и BCD090-M2 разной концентрации, после чего проводился анализ доли живых клеток на 4 и 7 дни. Как видно из рисунка 31b, добавление антител в суммарной

концентрации 1 мкг/мл приводило к статистически значимому снижению доли живых клеток SK-BR-3. Цитотоксический эффект нарастал со временем, и доля живых клеток в день 7 была существенно ниже чем в день 4. Полученный результат соответствует приведенным выше на рисунке 30b кривым роста клеток MCF-7, где добавление антител также вызывало пролонгированный эффект снижения пролиферации. При этом данные проточной цитофлуориметрии дополняют эксперименты по оценке пролиферации, демонстрируя, что однодоменные антитела не просто ведут к замедлению роста раковых клеток, но вызывают их гибель.

Исследованные в данной работе однодоменные антитела эффективно подавляют пролиферацию и оказывают цитотоксическое действие на клетки рака молочной железы с экспрессией рецептора ErbB3. Активность наиболее сильного кандидата, BCD090-P1, находится в наномолярном диапазоне ( $EC_{50} = 0.1$  мкг/мл  $\approx 7$  нМ) при подавлении пролиферации клеток MCF-7. Аффинность однодоменных антител к рецептору и их антипролиферативное действие сравнимы с находящимися в стадии клинических испытаний классическими IgG, в частности указанные параметры для BCD090-P1 практически идентичны характеристикам лумретумаба [37]. Функциональные свойства разработанных антител близки к другим альтернативным молекулам, разрабатываемым для блокирования ErbB3 — сурротелам [168] и аффителам [171], которые также подавляют пролиферацию клеток рака молочной железы MCF-7 и SK-BR-3 в концентрациях 10–100 нМ.

При этом, насколько позволяет судить анализ научной литературы, молекулы BCD090-P1 и BCD090-M2 являются первыми однодоменными антителами верблюдовых, способными подавлять ErbB3-зависимую пролиферацию клеток рака молочной железы. Ранее компанией-лидером в области нанотел Ablynx (с 2018 г. является частью Sanofi) была разработана панель однодоменных антител к рецептору ErbB3, последовательности и некоторые характеристики которых приведены в связанном патенте [254]. В единственной научной публикации, посвященной антителам верблюдовых к ErbB3, исследуется бипаратопное антитело MSB0010853, состоящее из двух однодоменных антител к субдомену I и другому неустановленному субдомену рецептора [255]. Несмотря на то, что аминокислотная последовательность MSB0010853 не приводится, можно предположить, что составляющие данную молекулу однодоменные антитела взяты из упомянутой панели Ablynx. При этом бипаратопное антитело MSB0010853 исследуется только как радиоконъюгат с  $^{89}\text{Zr}$  для позитронно-эмиссионной томографии и имаджинга опухолей, и никаких данных о его возможных терапевтических эффектах не приводится.

Поскольку однодоменные антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 взаимодействуют неконкурентно с субдоменами I и III рецептора ErbB3, и их антипролиферативное действие



обусловлено различными молекулярными механизмами, можно ожидать синергии при их совместном применении. Ранее было показано, что неконкурентное связывание двух антител с эктодоменом EGFR [256] и HER2 [257] ведет к усилению антипролиферативного действия, прежде всего за счет стимуляции эндоцитоза рецепторов. Аналогичная стратегия была применена к ErbB3, но дала сравнительно небольшое увеличение активности [258]. Исследованные однодоменные антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 обладают превосходными функциональными характеристиками, и дизайн биспецифических и бипаратопных молекул на их основе может реализовать синергию в подавлении активации рецептора ErbB3 и стимулировании его эндоцитоза.

---

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках представленного исследования разработаны и изучены новые однодоменные антитела ламы к рецептору ErbB3, которые потенциально могут быть применены для иммунотерапии онкологических заболеваний. Важная роль ErbB3 в прогрессии рака молочной железы стимулировала разработку ряда моноклональных антител для блокирования активации данного рецептора. Все эти антитела, в настоящее время находящиеся на разных стадиях клинических исследований, являются классическими иммуноглобулинами G. В данной работе реализован альтернативный подход, и получены неканонические антитела ламы, не имеющие легких цепей. Исследования этого особого класса иммуноглобулинов расширяют репертуар ингибирующих антител к рецептору ErbB3 и открывают новые иммунотерапевтические возможности.

Одним из результатов исследования стало совершенствование технологий молекулярной иммунологии. Важной задачей является разработка таких методов оперирования с высокорепрезентативными библиотеками иммунных молекул, которые позволят сохранять их репертуар. При помощи глубокого секвенирования было показано, что амплификация сложных библиотек фрагментов ДНК при помощи обычной полимеразной цепной реакции неэффективна и ведет к деградации клонального разнообразия. Инкапсуляция библиотек в капли эмульсии воды в масле повышает эффективность амплификации и помогает сохранить клональное разнообразие. В результате исследования впервые построена теоретическая модель амплификации ДНК библиотек в эмульсионной ПЦР, позволяющая понять закономерности этого процесса. Другой решенной в рамках исследования задачей стала разработка эффективной системы для гетерологической экспрессии однодоменных антител. Рекомбинантные антитела были получены в цитоплазме мутантного штамма бактерий *E. coli* в виде химер с белком SUMO, который затем был удален протеолитически. Такой подход позволил добиться получения растворимых фолдированных однодоменных антител без молекулярных тагов с высокой продуктивностью.

Другим результатом исследования стало детальное описание структурных и функциональных характеристик новых ингибирующих однодоменных антител к рецептору ErbB3. Методами макромолекулярной кристаллографии получены пространственные структуры однодоменного антитела BCD090-M2 высокого разрешения, исследован его паратоп и построена модель связывания с рецептором. Изучена денатурация антител и показано, что антитело BCD090-P1 обладает уникальной термодинамической стабильностью. На основе структурных данных выявлены молекулярные детерминанты конформационной стабильности и предложены пути рациональной инженерии антител для ее увеличения. Путем комбинации различных

биофизических и клеточных методов выявлено, что два наиболее перспективных антитела, BCD090-P1 и BCD090-M2, неконкурентно связываются с эпитопами на субдоменах III и I с наномолярной аффинностью и ингибируют ErbB3-зависимую пролиферацию раковых клеток. При этом антипролиферативный эффект однодоменных антител достигается разными молекулярными механизмами. Антитело BCD090-M2 блокирует связывание лиганда ErbB3, тогда как BCD090-P1 не конкурирует с лигандом напрямую и задействует более сложный аллостерический механизм.

В заключение можно отметить, что исследованные тяжелцепочечные антитела ламы обладают рядом существенных преимуществ над обычными IgG, которые могут быть реализованы как в формате полноразмерных антител с Fc фрагментом, способных задействовать эффекторные функции, так и в виде однодоменных антител, характеризующихся уникальной стабильностью и эффективностью биотехнологического производства. Во-первых, однодоменные антитела особенно хорошо подходят для дизайна биспецифических молекул к HER2:ErbB3 либо бипаратопных антител к ErbB3. Неконкурентное связывание BCD090-P1 и BCD090-M2 с различными эпитопами на ErbB3 позволяет предполагать, что бипаратопная молекула на их основе будет обладать повышенной авидностью и функциональной активностью. Во-вторых, однодоменные антитела представляют идеальную платформу для создания иммуноконъюгатов с цитотоксическими лекарствами. В настоящее время конъюгат классического анти-ErbB3 антитела патритумаба с дерукстеканом, разрабатываемый компанией Daiichi Sankyo, показывает многообещающие результаты в доклинических [164; 259] и клинических [260] исследованиях. Однодоменные антитела могут быть особенно эффективны в таком формате ввиду их высокой стабильности, растворимости и хорошего проникновения в ткани. В-третьих, малый размер и эффективный фолдинг однодоменных антител, не требующий спаривания цепей, позволяют разрабатывать терапевтические стратегии, в которых антитело кодируется при помощи мРНК [261] и может не только синтезироваться *in vivo* и секретироваться из клетки, но и ингибировать ErbB3-зависимую сигнализацию внутриклеточно путем блокирования биосинтеза и транспорта рецептора до его презентации на клеточной мембране.

---

## ВЫВОДЫ

1. Впервые построена теоретическая модель, описывающая процесс амплификации сложных ансамблей фрагментов ДНК при проведении полимеразной цепной реакции в каплях эмульсии воды в масле. Предсказания модели хорошо согласуются с экспериментальными данными и создают теоретическую основу для понимания эффекта деградации клонального разнообразия при амплификации библиотек ДНК.
  2. Наиболее эффективной системой получения растворимых однодоменных антител является их гетерологическая экспрессия в цитоплазме бактерий *E. coli*  $\Delta$ trxB  $\Delta$ gor cDsbC в виде химерной конструкции с белком SUMO.
  3. Разработанные однодоменные антитела к рецептору ErbB3 обладают высокой термодинамической стабильностью. Полученные кристаллические структуры позволяют выявить вероятные молекулярные детерминанты конформационной стабильности, изучить паратоп связывания и построить модель комплекса с эктодоменом рецептора ErbB3.
  4. Два разработанных однодоменных антитела BCD090-P1 и BCD090-M2 неконкурентно связываются с эпитопами на субдоменах III и I эктодомена рецептора ErbB3 с наномолярной аффинностью и эффективно подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию HER2<sup>-</sup> и HER2<sup>+</sup> клеток рака молочной железы.
-

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ehrlich P. Experimental researches on specific therapeutics : The Harben lectures for 1907 of the Royal Institute of Public Health / P. Ehrlich. – London : H. K. Lewis, 1908.
2. Köhler G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Köhler, C. Milstein // *Nature*. – 1975. – Vol. 256. – № 5517. – P. 495-497.
3. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens / P. C. Kung, G. Goldstein, E. L. Reinherz, S. F. Schlossman // *Science*. – 1979. – Vol. 206. – № 4416. – P. 347-349.
4. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody / A. B. Cosimi, R. C. Burton, R. B. Colvin [et al.] // *Transplantation*. – 1981. – Vol. 32. – № 6. – P. 535.
5. Winter G. Man-made antibodies / G. Winter, C. Milstein // *Nature*. – 1991. – Vol. 349. – № 6307. – P. 293-299.
6. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases / R.-M. Lu, Y.-C. Hwang, I.-J. Liu [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2020. – Vol. 27. – № 1. – P. 1.
7. Mullard A. FDA approves 100th monoclonal antibody product / A. Mullard // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2021. – Vol. 20. – № 7. – P. 491-495.
8. Meyer S. Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer / S. Meyer, J. H. Leusen, P. Boross // *mAbs*. – 2014. – Vol. 6. – № 5. – P. 1133-1144.
9. The role of Fc receptors on the effectiveness of therapeutic monoclonal antibodies / P. Gogesch, S. Dudek, G. van Zandbergen [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 16. – P. 8947.
10. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets / R. A. Clynes, T. L. Towers, L. G. Presta, J. V. Ravetch // *Nature Medicine*. – 2000. – Vol. 6. – № 4. – P. 443-446.
11. Unique pharmacology of a novel allosteric agonist/sensitizer insulin receptor monoclonal antibody / S. A. Hinke, A. M. Cieniewicz, T. Kirchner [et al.] // *Molecular Metabolism*. – 2018. – Vol. 10. – P. 87-99.
12. Structure-guided discovery of a single-domain antibody agonist against human apelin receptor / Y. Ma, Y. Ding, X. Song [et al.] // *Science Advances*. – 2020. – Vol. 6. – № 3. – P. eaax7379.
13. Tsao L.-C. Mechanisms of therapeutic antitumor monoclonal antibodies / L.-C. Tsao, J. Force, Z. C. Hartman // *Cancer Research*. – 2021. – Vol. 81. – № 18. – P. 4641-4651.
14. Gschwind A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy / A. Gschwind, O. M. Fischer, A. Ullrich // *Nature Reviews Cancer*. – 2004. – Vol. 4. – № 5. – P. 361-370.
15. Citri A. EGF-ERBB signalling: Towards the systems level / A. Citri, Y. Yarden // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2006. – Vol. 7. – № 7. – P. 505-516.
16. Hynes N. E. ErbB receptors and signaling pathways in cancer / N. E. Hynes, G. MacDonald // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2009. – Vol. 21. – № 2. – P. 177-184.

17. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling / R. N. Jorissen, F. Walker, N. Pouliot [et al.] // *The EGF receptor family* / ed. G. Carpenter. – Burlington : Academic Press, 2003. – P. 33-55.
18. Поляновский О. Л. ErbB онкогены - мишени моноклональных антител / О. Л. Поляновский, Е. Н. Лебедеенко, С. М. Деев // *Биохимия*. – 2012. – Vol. 77. – № 3. – P. 289-311.
19. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer / D. Cunningham, Y. Humblet, S. Siena [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2004. – Vol. 351. – № 4. – P. 337-345.
20. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2 / D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2001. – Vol. 344. – № 11. – P. 783-792.
21. Swain S. M. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions / S. M. Swain, M. Shastry, E. Hamilton // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2023. – Vol. 22. – № 2. – P. 101-126.
22. Insect cell-expressed p180(erbB3) possesses an impaired tyrosine kinase activity / P. M. Guy, J. V. Platko, L. C. Cantley [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – Vol. 91. – № 17. – P. 8132-8136.
23. Expression of the HER1–4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer / C. J. Witton, J. R. Reeves, J. J. Going [et al.] // *The Journal of Pathology*. – 2003. – Vol. 200. – № 3. – P. 290-297.
24. HER-3 Overexpression Is Prognostic of Reduced Breast Cancer Survival: A Study of 4046 Patients / C. G. Chiu, H. Masoudi, S. Leung [et al.] // *Annals of Surgery*. – 2010. – Vol. 251. – № 6. – P. 1107.
25. The erbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors / L. N. Klapper, S. Glathe, N. Vaisman [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1999. – Vol. 96. – № 9. – P. 4995-5000.
26. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3 / C. Wallasch, F. Ulrich Weiß, G. Niederfellner [et al.] // *EMBO Journal*. – 1995. – Vol. 14. – № 17. – P. 4267-4275.
27. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation / T. Holbro, R. R. Beerli, F. Maurer [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100. – № 15. – P. 8933-8938.
28. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway / R. Ben-Levy, H. F. Paterson, C. J. Marshall, Y. Yarden // *EMBO Journal*. – 1994. – Vol. 13. – № 14. – P. 3302-3311.
29. Prigent S. A. Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera / S. A. Prigent, W. J. Gullick // *EMBO Journal*. – 1994. – Vol. 13. – № 12. – P. 2831-2841.
30. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3 / N. V. Sergina, M. Rausch, D. Wang [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 445. – № 7126. – P. 437-441.

31. Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase / J. T. Garrett, M. G. Olivares, C. Rinehart [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 108. – № 12. – P. 5021-5026.
32. HER3, serious partner in crime: Therapeutic approaches and potential biomarkers for effect of HER3-targeting / A. Kol, A. G. T. Terwisscha Van Scheltinga, H. Timmer-Bosscha [et al.] // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2014. – Vol. 143. – № 1. – P. 1-11.
33. HER3/ErbB3, an emerging cancer therapeutic target / N. Zhang, Y. Chang, A. Rios, Z. An // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. – 2015. – Vol. 48. – № 1. – P. 39-48.
34. Targeting HER3 using mono- and bispecific antibodies or alternative scaffolds / M. Malm, F. Y. Frejd, S. Ståhl, J. Löfblom // *mAbs*. – 2016. – Vol. 8. – № 7. – P. 1195-1209.
35. HER3 signaling and targeted therapy in cancer / R. Mishra, H. Patel, S. Alanazi [et al.] // *Oncology Reviews*. – 2018. – Vol. 12. – № 1. – P. 45-62.
36. An antibody that locks HER3 in the inactive conformation inhibits tumor growth driven by HER2 or neuregulin / A. P. Garner, C. U. Bialucha, E. R. Sprague [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 19. – P. 6024-6035.
37. RG7116, a therapeutic antibody that binds the inactive HER3 receptor and is optimized for immune effector activation / C. Mirschberger, C. B. Schiller, M. Schraml [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 16. – P. 5183-5194.
38. Inhibition of ErbB3 by a monoclonal antibody that locks the extracellular domain in an inactive configuration / S. Lee, E. B. Greenlee, J. R. Amick [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112. – № 43. – P. 13225-13230.
39. Naturally occurring antibodies devoid of light chains / C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans [et al.] // *Nature*. – 1993. – Vol. 363. – № 6428. – P. 446-448.
40. Harmsen M. M. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments / M. M. Harmsen, H. J. De Haard // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – Vol. 77. – № 1. – P. 13-22.
41. Camel heavy-chain antibodies: Diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire / V. K. Nguyen, R. Hamers, L. Wyns, S. Muyldermans // *EMBO Journal*. – 2000. – Vol. 19. – № 5. – P. 921-930.
42. Rios M. de los. Structural and genetic diversity in antibody repertoires from diverse species / M. de los Rios, M. F. Criscitiello, V. V. Smider // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2015. – Vol. 33. – P. 27-41.
43. Steeland S. Nanobodies as therapeutics: Big opportunities for small antibodies / S. Steeland, R. E. Vandembroucke, C. Libert // *Drug Discovery Today*. – 2016. – Vol. 21. – № 7. – P. 1076-1113.
44. Duggan S. Caplacizumab: First Global Approval / S. Duggan // *Drugs*. – 2018. – Vol. 78. – № 15. – P. 1639-1642.
45. Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura / F. Peyvandi, M. Scully, J. A. Kremer Hovinga [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 374. – № 6. – P. 511-522.

46. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura / M. Scully, S. R. Cataland, F. Peyvandi [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2019. – Vol. 380. – № 4. – P. 335-346.
47. Cohen S. Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal / S. Cohen // *Journal of Biological Chemistry*. – 1962. – Vol. 237. – № 5. – P. 1555-1562.
48. Carpenter G. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro / G. Carpenter, L. King, S. Cohen // *Nature*. – 1978. – Vol. 276. – № 5686. – P. 409-410.
49. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system / M. Kasuga, Y. Zick, D. L. Blithe [et al.] // *Nature*. – 1982. – Vol. 298. – № 5875. – P. 667-669.
50. Schlessinger J. Receptor Tyrosine Kinases: Legacy of the First Two Decades / J. Schlessinger // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2014. – Vol. 6. – № 3. – P. a008912.
51. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences / J. Downward, Y. Yarden, E. Mayes [et al.] // *Nature*. – 1984. – Vol. 307. – № 5951. – P. 521-527.
52. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells / A. Ullrich, L. Coussens, J. S. Hayflick [et al.] // *Nature*. – 1984. – Vol. 309. – № 5967. – P. 418-425.
53. The erbB gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family / T. Yamamoto, T. Nishida, N. Miyajima [et al.] // *Cell*. – 1983. – Vol. 35. – № 1. – P. 71-78.
54. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen / A. L. Schechter, D. F. Stern, L. Vaidyanathan [et al.] // *Nature*. – 1984. – Vol. 312. – № 5994. – P. 513-516.
55. Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGF Receptor Shares Chromosomal Location with neu Oncogene / L. Coussens, T. L. Yang-Feng, Y.-C. Liao [et al.] // *Science*. – 1985. – Vol. 230. – № 4730. – P. 1132-1139.
56. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene / D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong [et al.] // *Science*. – 1987. – Vol. 235. – № 4785. – P. 177-182.
57. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. / M. H. Kraus, W. Issing, T. Miki [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1989. – Vol. 86. – № 23. – P. 9193-9197.
58. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. / G. D. Plowman, G. S. Whitney, M. G. Neubauer [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1990. – Vol. 87. – № 13. – P. 4905-4909.
59. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. / G. D. Plowman, J. M. Culouscou, G. S. Whitney [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1993. – Vol. 90. – № 5. – P. 1746-1750.
60. Harris R. C. EGF receptor ligands / R. C. Harris, E. Chung, R. J. Coffey // *The EGF Receptor Family* / ed. G. Carpenter. – Burlington : Academic Press, 2003. – P. 3-14.



61. Falls D. L. Neuregulins: Functions, forms, and signaling strategies / D. L. Falls // *The EGF Receptor Family* / ed. G. Carpenter. – Burlington : Academic Press, 2003. – P. 15-31.
62. Epigenetic regulation of Neuregulin 1 promotes breast cancer progression associated to hyperglycemia / C. Lee, M. Kim, C. Park [et al.] // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 439.
63. Hayes N. V. L. The Neuregulin Family of Genes and their Multiple Splice Variants in Breast Cancer / N. V. L. Hayes, W. J. Gullick // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. – 2008. – Vol. 13. – № 2. – P. 205-214.
64. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. / D. Karunakaran, E. Tzahar, R. R. Beerli [et al.] // *The EMBO Journal*. – 1996. – Vol. 15. – № 2. – P. 254-264.
65. Jones J. T. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors / J. T. Jones, R. W. Akita, M. X. Sliwkowski // *FEBS Letters*. – 1999. – Vol. 447. – № 2. – P. 227-231.
66. Epiregulin Is a Potent Pan-ErbB Ligand That Preferentially Activates Heterodimeric Receptor Complexes / M. Shelly, R. Pinkas-Kramarski, B. C. Guarino [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 17. – P. 10496-10505.
67. Formation of a high affinity heregulin binding site using the soluble extracellular domains of ErbB2 with ErbB3 or ErbB4 / V. D. Fitzpatrick, P. I. Pisacane, R. L. Vandlen, M. X. Sliwkowski // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 431. – № 1. – P. 102-106.
68. Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor alpha. / I. Lax, A. Johnson, R. Howk [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 1988. – Vol. 8. – № 5. – P. 1970-1978.
69. Cho H.-S. Structure of the Extracellular Region of HER3 Reveals an Interdomain Tether / H.-S. Cho, D. J. Leahy // *Science*. – 2002. – Vol. 297. – № 5585. – P. 1330-1333.
70. Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor  $\alpha$  / T. P. J. Garrett, N. M. McKern, M. Lou [et al.] // *Cell*. – 2002. – Vol. 110. – № 6. – P. 763-773.
71. Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains / H. Ogiso, R. Ishitani, O. Nureki [et al.] // *Cell*. – 2002. – Vol. 110. – № 6. – P. 775-787.
72. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab / H.-S. Cho, K. Mason, K. X. Ramyar [et al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 421. – № 6924. – P. 756-760.
73. Alvarado D. ErbB2 resembles an autoinhibited invertebrate epidermal growth factor receptor / D. Alvarado, D. E. Klein, M. A. Lemmon // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – № 7261. – P. 287-291.
74. Structures of the HER2–HER3–NRG1 $\beta$  complex reveal a dynamic dimer interface / D. Diwanji, R. Trenker, T. M. Thaker [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 600. – № 7888. – P. 339-343.
75. A single ligand is sufficient to activate EGFR dimers / P. Liu, T. E. Cleveland, S. Bouyain [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – № 27. – P. 10861-10866.
76. Structure and dynamics of the EGFR/HER2 heterodimer / X. Bai, P. Sun, X. Wang [et al.] // *Cell Discovery*. – 2023. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-16.

77. Rosen J. M. Paracrine signaling in mammary gland development: what can we learn about intratumoral heterogeneity? / J. M. Rosen, K. Roarty // *Breast Cancer Research*. – 2014. – Vol. 16. – № 1. – P. 202.
78. The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor / S. Higashiyama, R. Iwamoto, K. Goishi [et al.] // *The Journal of Cell Biology*. – 1995. – Vol. 128. – № 5. – P. 929-938.
79. Wang J. Y. The N-terminal Region of Neuregulin Isoforms Determines the Accumulation of Cell Surface and Released Neuregulin Ectodomain / J. Y. Wang, S. J. Miller, D. L. Falls // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – № 4. – P. 2841-2851.
80. Nicholson K. M. Autocrine signalling through erbB receptors promotes constitutive activation of protein kinase B/Akt in breast cancer cell lines / K. M. Nicholson, C. H. Streuli, N. G. Anderson // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2003. – Vol. 81. – № 2. – P. 117-128.
81. An heregulin-EGFR-HER3 autocrine signaling axis can mediate acquired lapatinib resistance in HER2+ breast cancer models / W. Xia, E. F. Petricoin, S. Zhao [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2013. – Vol. 15. – № 5. – P. R85.
82. An activated ErbB3/NRG1 autocrine loop supports in vivo proliferation in ovarian cancer cells / Q. Sheng, X. Liu, E. Fleming [et al.] // *Cancer cell*. – 2010. – Vol. 17. – № 3. – P. 298-310.
83. Autocrine activation of ErbB2/ErbB3 receptor complex by NRG-1 in non-small cell lung cancer cell lines / M. Gollamudi, D. Nethery, J. Liu, J. A. Kern // *Lung Cancer*. – 2004. – Vol. 43. – № 2. – P. 135-143.
84. Yarden Y. Untangling the ErbB signalling network / Y. Yarden, M. X. Sliwkowski // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2001. – Vol. 2. – № 2. – P. 127-137.
85. Lemmon M. A. Ligand-induced ErbB receptor dimerization : Invited Reviews: ErbB Receptors / M. A. Lemmon // *Experimental Cell Research*. – 2009. – Vol. 315. – № 4. – P. 638-648.
86. An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors / A. W. Burgess, H.-S. Cho, C. Eigenbrot [et al.] // *Molecular Cell*. – 2003. – Vol. 12. – № 3. – P. 541-552.
87. Sako Y. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells / Y. Sako, S. Minoghchi, T. Yanagida // *Nature Cell Biology*. – 2000. – Vol. 2. – № 3. – P. 168-172.
88. Single-molecule functional anatomy of endogenous HER2-HER3 heterodimers / B. Choi, M. Cha, G. S. Eun [et al.] // *eLife*. – 2020. – Vol. 9. – P. e53934.
89. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: Implications for cancer / K. J. Wilson, J. L. Gilmore, J. Foley [et al.] // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2009. – Vol. 122. – № 1. – P. 1-8.
90. Macdonald J. L. Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system / J. L. Macdonald, L. J. Pike // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 1. – P. 112-117.
91. Alvarado D. Structural Basis for Negative Cooperativity in Growth Factor Binding to an EGF Receptor / D. Alvarado, D. E. Klein, M. A. Lemmon // *Cell*. – 2010. – Vol. 142. – № 4. – P. 568-579.
92. EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics / D. M. Freed, N. J. Bessman, A. Kiyatkin [et al.] // *Cell*. – 2017. – Vol. 171. – № 3. – P. 683-695.e18.

93. Extensive conformational and physical plasticity protects HER2-HER3 tumorigenic signaling / M. R. Campbell, A. Ruiz-Saenz, Y. Zhang [et al.] // *Cell Reports*. – 2022. – Vol. 38. – № 5. – P. 110285.
94. Baselga J. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3 / J. Baselga, S. M. Swain // *Nature Reviews Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – № 7. – P. 463-475.
95. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation / F. Shi, S. E. Telesco, Y. Liu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 17. – P. 7692-7697.
96. Receptor tyrosine kinases with intracellular pseudokinase domains / J. M. Mendrola, F. Shi, J. H. Park, M. A. Lemmon // *Biochemical Society Transactions*. – 2013. – Vol. 41. – № 4. – P. 1029-1036.
97. An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor / X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen [et al.] // *Cell*. – 2006. – Vol. 125. – № 6. – P. 1137-1149.
98. Structural analysis of the EGFR/HER3 heterodimer reveals the molecular basis for activating HER3 mutations / P. Littlefield, L. Liu, V. Mysore [et al.] // *Science Signaling*. – 2014. – Vol. 7. – № 354. – P. ra114-ra114.
99. Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion / A. Appert-Collin, P. Hubert, G. Crémel, A. Bennisroune // *Frontiers in Pharmacology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 283.
100. Kumagai S. Antitumour immunity regulated by aberrant ERBB family signalling / S. Kumagai, S. Koyama, H. Nishikawa // *Nature Reviews Cancer*. – 2021. – Vol. 21. – № 3. – P. 181-197.
101. Targeted Disruption of Mouse EGF receptor: Effect of Genetic Background on Mutant Phenotype / D. W. Threadgill, A. A. Dlugosz, L. A. Hansen [et al.] // *Science*. – 1995. – Vol. 269. – № 5221. – P. 230-234.
102. Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development / N. C. Luetkeke, T. H. Qiu, S. E. Fenton [et al.] // *Development*. – 1999. – Vol. 126. – № 12. – P. 2739-2750.
103. Meyer D. Multiple essential functions of neuregulin in development / D. Meyer, C. Birchmeier // *Nature*. – 1995. – Vol. 378. – № 6555. – P. 386-390.
104. Generation and Characterization of Neuregulin-2-Deficient Mice / J. M. Britto, S. Lukehurst, R. Weller [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 2004. – Vol. 24. – № 18. – P. 8221-8226.
105. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development / K.-F. Lee, H. Simon, H. Chen [et al.] // *Nature*. – 1995. – Vol. 378. – № 6555. – P. 394-398.
106. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor / M. Gassmann, F. Casagrande, D. Orioli [et al.] // *Nature*. – 1995. – Vol. 378. – № 6555. – P. 390-394.
107. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice / S. L. Erickson, K. S. O'Shea, N. Ghaboosi [et al.] // *Development*. – 1997. – Vol. 124. – № 24. – P. 4999-5011.
108. Schroeder J. A. Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland / J. A. Schroeder, D. C. Lee // *Cell Growth & Differentiation*. – 1998. – Vol. 9. – № 6. – P. 451-464.

109. Ciarloni L. Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor  $\alpha$  function in mammary gland development / L. Ciarloni, S. Mallepell, C. Brisken // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104. – № 13. – P. 5455-5460.
110. Stern D. F. ErbBs in mammary development / D. F. Stern // *The EGF Receptor Family* / ed. G. Carpenter. – Burlington : Academic Press, 2003. – P. 93-102.
111. Keefe D. L. Trastuzumab-associated cardiotoxicity / D. L. Keefe // *Cancer*. – 2002. – Vol. 95. – № 7. – P. 1592-1600.
112. Lemmens K. Role of Neuregulin-1/ErbB Signaling in Cardiovascular Physiology and Disease / K. Lemmens, K. Doggen, G. W. De Keulenaer // *Circulation*. – 2007. – Vol. 116. – № 8. – P. 954-960.
113. Cardiac Endothelial Cells Regulate Reactive Oxygen Species-induced Cardiomyocyte Apoptosis through Neuregulin-1 $\beta$ /erbB4 Signaling / Y. Kuramochi, G. M. Cote, X. Guo [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 49. – P. 51141-51147.
114. Neuregulin-1 Induces a Negative Inotropic Effect in Cardiac Muscle / K. Lemmens, P. Fransen, S. U. Sys [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – № 3. – P. 324-326.
115. Nave K.-A. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1 : Neuronal and glial cell biology / New technologies / K.-A. Nave, J. L. Salzer // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2006. – Vol. 16. – № 5. – P. 492-500.
116. Neuregulin-1 controls an endogenous repair mechanism after spinal cord injury / K. Bartus, J. Galino, N. D. James [et al.] // *Brain*. – 2016. – Vol. 139. – № 5. – P. 1394-1416.
117. ErbB receptor signaling directly controls oligodendrocyte progenitor cell transformation and spontaneous remyelination after spinal cord injury / K. Bartus, E. R. Burnside, J. Galino [et al.] // *Glia*. – 2019. – Vol. 67. – № 6. – P. 1036-1046.
118. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer / T. Cooke, J. Reeves, A. Lanigan, P. Stanton // *Annals of Oncology*. – 2001. – Vol. 12. – P. S23-S28.
119. Molecular portraits of human breast tumours / C. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 406. – № 6797. – P. 747-752.
120. Gravalos C. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target / C. Gravalos, A. Jimeno // *Annals of Oncology*. – 2008. – Vol. 19. – № 9. – P. 1523-1529.
121. HER2 Status in Colorectal Cancer: Its Clinical Significance and the Relationship between HER2 Gene Amplification and Expression / A. N. Seo, Y. Kwak, D.-W. Kim [et al.] // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 5. – P. e98528.
122. Epidermal Growth Factor Receptor and HER2-neu mRNA Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Is Correlated with Survival / J. Brabender, K. D. Danenberg, R. Metzger [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2001. – Vol. 7. – № 7. – P. 1850-1855.
123. Nicholson R. I. EGFR and cancer prognosis / R. I. Nicholson, J. M. W. Gee, M. E. Harper // *European Journal of Cancer*. – 2001. – Vol. 37. – P. 9-15.
124. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival / J.-P. Spano, C. Lagorce, D. Atlan [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2005. – Vol. 16. – № 1. – P. 102-108.

125. Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer / D. J. Jonker, C. J. O'Callaghan, C. S. Karapetis [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol. 357. – № 20. – P. 2040-2048.
126. Cetuximab Shows Activity in Colorectal Cancer Patients With Tumors That Do Not Express the Epidermal Growth Factor Receptor by Immunohistochemistry / K. Y. Chung, J. Shia, N. E. Kemeny [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2005. – Vol. 23. – № 9. – P. 1803-1810.
127. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib / T. J. Lynch, D. W. Bell, R. Sordella [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2004. – Vol. 350. – № 21. – P. 2129-2139.
128. Ligand-Independent EGFR Signaling / G. Guo, K. Gong, B. Wohlfeld [et al.] // *Cancer Research*. – 2015. – Vol. 75. – № 17. – P. 3436-3441.
129. Differential Constitutive Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Non–Small Cell Lung Cancer Cells Bearing EGFR Gene Mutation and Amplification / T. Okabe, I. Okamoto, K. Tamura [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – № 5. – P. 2046-2053.
130. Huang P. H. Oncogenic EGFR Signaling Networks in Glioma / P. H. Huang, A. M. Xu, F. M. White // *Science Signaling*. – 2009. – Vol. 2. – № 87. – P. re6.
131. Activating HER2 Mutations in HER2 Gene Amplification Negative Breast Cancer / R. Bose, S. M. Kavuri, A. C. Searleman [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2013. – Vol. 3. – № 2. – P. 224-237.
132. Hanahan D. The Hallmarks of Cancer / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell*. – 2000. – Vol. 100. – № 1. – P. 57-70.
133. Ellis L. M. Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis / L. M. Ellis // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. – 2004. – Vol. 18. – № 5. – P. 1007-1021.
134. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer / G. von Minckwitz, M. Procter, E. de Azambuja [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Vol. 377. – № 2. – P. 122-131.
135. Differential Sensitivity of ERBB2 Kinase Domain Mutations towards Lapatinib / R. K. Kancha, N. von Bubnoff, N. Bartosch [et al.] // *PLOS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 10. – P. e26760.
136. Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer / M. Scaltriti, F. Rojo, A. Ocaña [et al.] // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 2007. – Vol. 99. – № 8. – P. 628-638.
137. PIK3CA mutations are associated with reduced pathological complete response rates in primary HER2-positive breast cancer: pooled analysis of 967 patients from five prospective trials investigating lapatinib and trastuzumab / S. Loibl, I. Majewski, V. Guarneri [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2016. – Vol. 27. – № 8. – P. 1519-1525.
138. Frequent Mutational Activation of the PI3K-AKT Pathway in Trastuzumab-Resistant Breast Cancer / S. Chandralapaty, R. A. Sakr, D. Giri [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2012. – Vol. 18. – № 24. – P. 6784-6791.
139. A Hierarchical Network of Interreceptor Interactions Determines Signal Transduction by Neu Differentiation Factor/Neuregulin and Epidermal Growth Factor / E. Tzahar, H. Waterman, X. Chen [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 1996. – Vol. 16. – № 10. – P. 5276-5287.

140. MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling / J. A. Engelman, K. Zejnullahu, T. Mitsudomi [et al.] // *Science*. – 2007. – Vol. 316. – № 5827. – P. 1039-1043.
141. Activating HER3 mutations in breast cancer / R. Mishra, S. Alanazi, L. Yuan [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 45. – P. 27773-27788.
142. Co-occurring gain-of-function mutations in HER2 and HER3 modulate HER2/HER3 activation, oncogenesis, and HER2 inhibitor sensitivity / A. B. Hanker, B. P. Brown, J. Meiler [et al.] // *Cancer Cell*. – 2021. – Vol. 39. – № 8. – P. 1099-1114.e8.
143. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. / P. Carter, L. Presta, C. M. Gorman [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1992. – Vol. 89. – № 10. – P. 4285-4289.
144. Hudis C. A. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice / C. A. Hudis // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol. 357. – № 1. – P. 39-51.
145. Nahta R. The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells / R. Nahta, M.-C. Hung, F. J. Esteva // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64. – № 7. – P. 2343-2346.
146. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer / S. M. Swain, J. Baselga, S.-B. Kim [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Vol. 372. – № 8. – P. 724-734.
147. Efficacy of Margetuximab vs Trastuzumab in Patients With Pretreated ERBB2-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 3 Randomized Clinical Trial / H. S. Rugo, S.-A. Im, F. Cardoso [et al.] // *JAMA Oncology*. – 2021. – Vol. 7. – № 4. – P. 573-584.
148. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline / A. F. Labrijn, M. L. Janmaat, J. M. Reichert, P. W. H. I. Parren // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2019. – Vol. 18. – № 8. – P. 585-608.
149. Abstract 1005: The bispecific antibody zanidatamab's (ZW25's) unique mechanisms of action and durable anti-tumor activity in HER2-expressing cancers / N. E. Weissner, G. Wickman, L. Abraham [et al.] // *Cancer Research*. – 2021. – Vol. 81. – Abstract 1005. – № 13\_Supplement. – P. 1005.
150. First-in-human HER2-targeted Bispecific Antibody KN026 for the Treatment of Patients with HER2-positive Metastatic Breast Cancer: Results from a Phase I Study / J. Zhang, D. Ji, L. Cai [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2021. – Vol. 28. – № 4. – P. 618-628.
151. Haikala H. M. Thirty Years of HER3: From Basic Biology to Therapeutic Interventions / H. M. Haikala, P. A. Jänne // *Clinical Cancer Research*. – 2021. – Vol. 27. – № 13. – P. 3528-3539.
152. A Novel Therapeutic Anti-ErbB3, ISU104 Exhibits Potent Antitumorigenic Activity by Inhibiting Ligand Binding and ErbB3 Heterodimerization / M. Hong, Y. Yoo, M. Kim [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2021. – Vol. 20. – № 6. – P. 1142-1152.
153. Unbiased Combinatorial Screening Identifies a Bispecific IgG1 that Potently Inhibits HER3 Signaling via HER2-Guided Ligand Blockade / C. A. W. Geuijen, C. D. Nardis, D. Maussang [et al.] // *Cancer Cell*. – 2018. – Vol. 33. – № 5. – P. 922-936.e10.

154. Zenocutuzumab, a HER2xHER3 Bispecific Antibody, Is Effective Therapy for Tumors Driven by *NRG1* Gene Rearrangements / A. M. Schram, I. Odintsov, M. Espinosa-Cotton [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2022. – Vol. 12. – № 5. – P. 1233-1247.
155. Antitumor Activity of a Novel Bispecific Antibody That Targets the ErbB2/ErbB3 Oncogenic Unit and Inhibits Heregulin-Induced Activation of ErbB3 / C. F. McDonagh, A. Huhlov, B. D. Harms [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2012. – Vol. 11. – № 3. – P. 582-593.
156. Chau C. H. Antibody–drug conjugates for cancer / C. H. Chau, P. S. Steeg, W. D. Figg // *The Lancet*. – 2019. – Vol. 394. – № 10200. – P. 793-804.
157. Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates / A. Beck, L. Goetsch, C. Dumontet, N. Corvaia // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2017. – Vol. 16. – № 5. – P. 315-337.
158. Bystander effect of antibody–drug conjugates: fact or fiction? / F. Giugliano, C. Corti, P. Tarantino [et al.] // *Current Oncology Reports*. – 2022. – Vol. 24. – № 7. – P. 809-817.
159. Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody–Cytotoxic Drug Conjugate / G. D. Lewis Phillips, G. Li, D. L. Dugger [et al.] // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 22. – P. 9280-9290.
160. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer / G. von Minckwitz, C.-S. Huang, M. S. Mano [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2019. – Vol. 380. – № 7. – P. 617-628.
161. Yver A. The art of innovation: clinical development of trastuzumab deruxtecan and redefining how antibody-drug conjugates target HER2-positive cancers / A. Yver, T. Agatsuma, J.-C. Soria // *Annals of Oncology*. – 2020. – Vol. 31. – № 3. – P. 430-434.
162. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer / S. Modi, C. Saura, T. Yamashita [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382. – № 7. – P. 610-621.
163. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer / S. Modi, W. Jacot, T. Yamashita [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 387. – № 1. – P. 9-20.
164. U3-1402, a Novel HER3-Targeting Antibody–Drug Conjugate, for the Treatment of Colorectal Cancer / S. Koganemaru, Y. Kuboki, Y. Koga [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2019. – Vol. 18. – № 11. – P. 2043-2050.
165. EV20-mediated delivery of cytotoxic auristatin MMAF exhibits potent therapeutic efficacy in cutaneous melanoma / E. Capone, A. Lamolinara, D. D'Agostino [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2018. – Vol. 277. – P. 48-56.
166. Pharmacological targeting of the pseudokinase Her3 / T. Xie, S. M. Lim, K. D. Westover [et al.] // *Nature Chemical Biology*. – 2014. – Vol. 10. – № 12. – P. 1006-1012.
167. Combinatorial surrobody libraries / L. Xu, H. Yee, C. Chan [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – № 31. – P. 10756-10761.

168. ErbB3 Inhibitory Surroboodies Inhibit Tumor Cell Proliferation In Vitro and In Vivo / P. K. Foreman, M. Gore, P. A. Kobel [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2012. – Vol. 11. – № 7. – P. 1411-1420.
169. Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications : Gothenburg Special Issue: Molecules of Life / J. Löfblom, J. Feldwisch, V. Tolmachev [et al.] // *FEBS Letters*. – 2010. – Vol. 584. – № 12. – P. 2670-2680.
170. Combining phage and staphylococcal surface display for generation of ErbB3-specific Affibody molecules / N. Kronqvist, M. Malm, L. Göstring [et al.] // *Protein Engineering, Design and Selection*. – 2011. – Vol. 24. – № 4. – P. 385-396.
171. Cellular effects of HER3-specific Affibody molecules / L. Göstring, M. Malm, I. Höiden-Guthenberg [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 6. – P. e40023.
172. An Unfolded CH1 Domain Controls the Assembly and Secretion of IgG Antibodies / M. J. Feige, S. Groscurth, M. Marcinowski [et al.] // *Molecular Cell*. – 2009. – Vol. 34. – № 5. – P. 569-579.
173. Exploiting sequence and stability information for directing nanobody stability engineering / P. Kunz, T. Flock, N. Soler [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2017. – Vol. 1861. – № 9. – P. 2196-2205.
174. Vermeer A. W. P. The Thermal Stability of Immunoglobulin: Unfolding and Aggregation of a Multi-Domain Protein / A. W. P. Vermeer, W. Norde // *Biophysical Journal*. – 2000. – Vol. 78. – № 1. – P. 394-404.
175. The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance / P. Kunz, K. Zinner, N. Mücke [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 7934.
176. Comparative Analysis of Immune Repertoires between Bactrian Camel's Conventional and Heavy-Chain Antibodies / X. Li, X. Duan, K. Yang [et al.] // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 9. – P. e0161801.
177. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies / E. De Genst, K. Silence, K. Decanniere [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103. – № 12. – P. 4586-4591.
178. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology / E. Pardon, T. Laeremans, S. Triest [et al.] // *Nature Protocols*. – 2014. – Vol. 9. – № 3. – P. 674-693.
179. Bélanger K. High-efficacy, high-manufacturability human VH domain antibody therapeutics from transgenic sources / K. Bélanger, J. Tanha // *Protein Engineering, Design and Selection*. – 2021. – Vol. 34. – P. gzab012.
180. Generation of heavy-chain-only antibodies in mice / R. Janssens, S. Dekker, R. W. Hendriks [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103. – № 41. – P. 15130-15135.
181. Expression Cloning and Production of Human Heavy-Chain-Only Antibodies from Murine Transgenic Plasma Cells / D. Drabek, R. Janssens, E. de Boer [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 619.
182. NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies / S. Moutel, N. Bery, V. Bernard [et al.] // *eLife*. – 2016. – Vol. 5. – NaLi-H1. – P. e16228.



183. Hoogenboom H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries / H. R. Hoogenboom // *Nature Biotechnology*. – 2005. – Vol. 23. – № 9. – P. 1105-1116.
184. Selection of human antibody fragments by phage display / C. M. Y. Lee, N. Iorno, F. Sierro, D. Christ // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 2. – № 11. – P. 3001-3008.
185. Ghadessy F. J. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication / F. J. Ghadessy, J. L. Ong, P. Holliger // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 98. – № 8. – P. 4552-4557.
186. Rare, high-affinity anti-pathogen antibodies from human repertoires, discovered using microfluidics and molecular genomics / A. S. Adler, R. A. Mizrahi, M. J. Spindler [et al.] // *mAbs*. – 2017. – Vol. 9. – № 8. – P. 1282-1296.
187. Liu Y. Expression of single-domain antibody in different systems / Y. Liu, H. Huang // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 102. – № 2. – P. 539-551.
188. Large-scale production of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae* : Third International Symposium on Industrial Proteins / Y. E. Thomassen, W. Meijer, L. Sierkstra, C. T. Verrips // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2002. – Vol. 30. – № 3. – P. 273-278.
189. A rice-based soluble form of a murine TNF-specific llama variable domain of heavy-chain antibody suppresses collagen-induced arthritis in mice / M. Abe, Y. Yuki, S. Kurokawa [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2014. – Vol. 175. – P. 45-52.
190. Kipriyanov S. M. High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures / S. M. Kipriyanov, G. Moldenhauer, M. Little // *Journal of Immunological Methods*. – 1997. – Vol. 200. – № 1-2. – P. 69-77.
191. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm / J. Lobstein, C. A. Emrich, C. Jeans [et al.] // *Microbial Cell Factories*. – 2012. – Vol. 11. – № 1. – P. 753.
192. High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli* / K. Zarschler, S. Witcey, F. Kapplusch [et al.] // *Microbial Cell Factories*. – 2013. – Vol. 12. – № 1. – P. 97.
193. Tillib S. V. Prospective Applications of Single-Domain Antibodies in Biomedicine / S. V. Tillib // *Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 54. – № 3. – P. 317-326.
194. Nanobodies: A Review of Generation, Diagnostics and Therapeutics / B. Jin, S. Odongo, M. Radwanska, S. Magez // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 6. – P. 5994.
195. Orally delivered single-domain antibodies against gastrointestinal pathogens / M. Petersson, S. W. Thrane, L. Gram [et al.] // *Trends in Biotechnology*. – 2023. – epub ahead of print.
196. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection / D. Tokuhara, B. Alvarez, M. Mejima [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2013. – Vol. 123. – № 9. – P. 3829-3838.
197. Nebulised ALX-0171 for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in hospitalised children: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial / S. Cunningham,

- P. A. Piedra, F. Martinon-Torres [et al.] // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2021. – Vol. 9. – № 1. – P. 21-32.
198. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants / J. Xu, K. Xu, S. Jung [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 595. – № 7866. – P. 278-282.
199. Inhalable Nanobody (PiN-21) prevents and treats SARS-CoV-2 infections in Syrian hamsters at ultra-low doses / S. Nambulli, Y. Xiang, N. L. Tilston-Lunel [et al.] // *Science Advances*. – 2021. – Vol. 7. – № 22. – P. eabh0319.
200. In vivo and in vitro characterization of TEV protease mutants / L. Wei, X. Cai, Z. Qi [et al.] // *Protein Expression and Purification*. – 2012. – Vol. 83. – № 2. – P. 157-163.
201. Integration of PCR Fragments at Any Specific Site within Cloning Vectors without the Use of Restriction Enzymes and DNA Ligase / M. Geiser, R. Cébe, D. Drewello, R. Schmitz // *BioTechniques*. – 2001. – Vol. 31. – № 1. – P. 88-92.
202. Inoue H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids / H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama // *Gene*. – 1990. – Vol. 96. – № 1. – P. 23-28.
203. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics / P. J. A. Cock, T. Antao, J. T. Chang [et al.] // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25. – № 11. – P. 1422-1423.
204. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker [et al.] // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25. – № 16. – P. 2078-2079.
205. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads / M. Martin // *EMBnet.journal*. – 2011. – Vol. 17. – № 1. – P. 10-12.
206. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences / H. Li // *Bioinformatics*. – 2018. – Vol. 34. – № 18. – P. 3094-3100.
207. SSW Library: An SIMD Smith-Waterman C/C++ Library for Use in Genomic Applications / M. Zhao, W.-P. Lee, E. P. Garrison, G. T. Marth // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 12. – P. e82138.
208. Nossal N. G. The Release of Enzymes by Osmotic Shock from *Escherichia coli* in Exponential Phase / N. G. Nossal, L. A. Heppel // *Journal of Biological Chemistry*. – 1966. – Vol. 241. – № 13. – P. 3055-3062.
209. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy / A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112. – № 24. – P. E3095-E3103.
210. BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra / A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – № W1. – P. W315-W322.
211. Thannhauser T. W. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins / T. W. Thannhauser, Y. Konishi, H. A. Scheraga // *Analytical Biochemistry*. – 1984. – Vol. 138. – № 1. – P. 181-188.

212. Using theoretical protein isotopic distributions to parse small-mass-difference post-translational modifications via mass spectrometry / T. W. Rhoads, J. R. Williams, N. I. Lopez [et al.] // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2013. – Vol. 24. – № 1. – P. 115-124.
213. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 596. – № 7873. – P. 583-589.
214. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer / R. Evans, M. O'Neill, A. Pritzel, [et al.]. – bioRxiv, 2021.
215. ColabFold: making protein folding accessible to all / M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki [et al.] // *Nature Methods*. – 2022. – Vol. 19. – № 6. – P. 679-682.
216. Goodsell D. S. Illustrate: Software for Biomolecular Illustration / D. S. Goodsell, L. Autin, A. J. Olson // *Structure*. – 2019. – Vol. 27. – № 11. – P. 1716-1720.e1.
217. Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors / Y. N. Abdiche, D. S. Malashock, A. Pinkerton, J. Pons // *Analytical Biochemistry*. – 2009. – Vol. 386. – № 2. – P. 172-180.
218. Wisdom G. B. Conjugation of antibodies to fluorescein or rhodamine. / G. B. Wisdom // *Immunochemical Protocols. Methods in Molecular Biology Vol. 295* / ed. R. Burns. – Totowa, NJ : Humana Press, 2005. – P. 131-134.
219. Endocrine response phenotypes are altered by charcoal-stripped serum variability / M. J. Sikora, M. D. Johnson, A. V. Lee, S. Oesterreich // *Endocrinology*. – 2016. – Vol. 157. – № 10. – P. 3760-3766.
220. Potapov V. Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing / V. Potapov, J. L. Ong // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. e0169774.
221. Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR / R. Williams, S. G. Peisajovich, O. J. Miller [et al.] // *Nature Methods*. – 2006. – Vol. 3. – № 7. – P. 545-550.
222. Functional interrogation and mining of natively paired human VH:VL antibody repertoires / B. Wang, B. J. DeKosky, M. R. Timm [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2018. – Vol. 36. – № 2. – P. 152-155.
223. Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information / S. S. Terekhov, I. E. Eliseev, L. A. Ovchinnikova [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117. – № 44. – P. 27300-27306.
224. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO / J. G. Marblestone, S. C. Edavettal, Y. Lim [et al.] // *Protein Science*. – 2006. – Vol. 15. – № 1. – P. 182-189.
225. Targeting ErbB3 Receptor in Cancer with Inhibitory Antibodies from Llama / I. E. Eliseev, V. M. Ukrainskaya, A. N. Yudenko [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – № 9. – P. 1106.
226. Rusch S. L. Interactions That Drive Sec-Dependent Bacterial Protein Transport / S. L. Rusch, D. A. Kendall // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – № 34. – P. 9665-9673.
227. Rashid M. H. Full-length recombinant antibodies from *Escherichia coli*: production, characterization, effector function (Fc) engineering, and clinical evaluation / M. H. Rashid // *mAbs*. – 2022. – Vol. 14. – № 1. – P. 2111748.

228. Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria / M.-P. Robinson, N. Ke, J. Lobstein [et al.] // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 8072.
229. Greenfield N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure / N. J. Greenfield // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1. – № 6. – P. 2876-2890.
230. Tetin S. Y. Accuracy of protein secondary structure determination from circular dichroism spectra based on immunoglobulin examples / S. Y. Tetin, F. G. Prendergast, S. Y. Venyaminov // *Analytical Biochemistry*. – 2003. – Vol. 321. – № 2. – P. 183-187.
231. Comparison of Ellman's reagent with N-(1-pyrenyl)maleimide for the determination of free sulfhydryl groups in reduced cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* / J. Woodward, J. Tate, Paul. C. Herrmann, B. R. Evans // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 1993. – Vol. 26. – № 2. – P. 121-129.
232. Riener C. K. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine / C. K. Riener, G. Kada, H. J. Gruber // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2002. – Vol. 373. – № 4-5. – P. 266-276.
233. Doll S. Mass spectrometry-based detection and assignment of protein posttranslational modifications / S. Doll, A. L. Burlingame // *ACS Chemical Biology*. – 2015. – Vol. 10. – № 1. – P. 63-71.
234. Thermodynamic Analysis of the Conformational Stability of a Single-Domain Therapeutic Antibody / I. E. Eliseev, A. N. Yudenko, N. A. Besedina [et al.] // *Technical Physics Letters*. – 2017. – Vol. 43. – № 12. – P. 1088-1091.
235. ProThermDB: thermodynamic database for proteins and mutants revisited after 15 years / R. Nikam, A. Kulandaisamy, K. Harini [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Vol. 49. – № D1. – P. D420-D424.
236. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution / P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkóczi [et al.] // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2010. – Vol. 66. – № 2. – P. 213-221.
237. Bunkóczi G. Improvement of molecular-replacement models with Sculptor / G. Bunkóczi, R. J. Read // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2011. – Vol. 67. – № 4. – P. 303-312.
238. Phaser crystallographic software / A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams [et al.] // *Journal of Applied Crystallography*. – 2007. – Vol. 40. – № 4. – P. 658-674.
239. Structural evaluation of a nanobody targeting complement receptor Vsig4 and its cross reactivity / Y. Wen, Z. Ouyang, S. Schoonoghe [et al.] // *Immunobiology*. – 2017. – Vol. 222. – № 6. – P. 807-813.
240. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard / T. C. Terwilliger, R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine [et al.] // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2008. – Vol. 64. – № 1. – P. 61-69.
241. Features and development of Coot / P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2010. – Vol. 66. – № 4. – P. 486-501.

242. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine / P. V. Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, N. Echols [et al.] // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2012. – Vol. 68. – № 4. – P. 352-367.
243. Crystal structures of a llama VHH antibody BCD090-M2 targeting human ErbB3 receptor / I. E. Eliseev, A. N. Yudenko, V. V. Vysochinskaya [et al.] // *F1000Research*. – 2018. – Vol. 7. – P. 57.
244. Al-Lazikani B. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins // Edited by I. A. Wilson / B. Al-Lazikani, A. M. Lesk, C. Chothia // *Journal of Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 273. – № 4. – P. 927-948.
245. PyIgClassify: a database of antibody CDR structural classifications / J. Adolf-Bryfogle, Q. Xu, B. North [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43. – № D1. – P. D432-D438.
246. Cadmium SAD phasing at CuK $\alpha$  wavelength / I. E. Eliseev, A. N. Yudenko, V. M. Ukrainskaya, O. B. Chakchir // *F1000Research*. – 2019. – Vol. 8. – P. 84.
247. Cadmium-induced crystallization of proteins: II. Crystallization of the *Salmonella typhimuri* histidine-binding protein in complex with L-histidine, L-arginine, or L-lysine / G. F.-L. Ames, D. I. Kreimer, S. Trakhanov [et al.] // *Protein Science*. – 1998. – Vol. 7. – № 3. – P. 600-604.
248. Harnessing protein folding neural networks for peptide–protein docking / T. Tsaban, J. K. Varga, O. Avraham [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 176.
249. Benchmarking AlphaFold for protein complex modeling reveals accuracy determinants / R. Yin, B. Y. Feng, A. Varshney, B. G. Pierce // *Protein Science*. – 2022. – Vol. 31. – № 8. – P. e4379.
250. Holliday D. L. Choosing the right cell line for breast cancer research / D. L. Holliday, V. Speirs // *Breast Cancer Research*. – 2011. – Vol. 13. – № 4. – P. 215.
251. A single-cell analysis of breast cancer cell lines to study tumour heterogeneity and drug response / G. Gambardella, G. Viscido, B. Tumaini [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 1714.
252. Berthois Y. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture / Y. Berthois, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1986. – Vol. 83. – № 8. – P. 2496-2500.
253. Trastuzumab-Resistant Breast Cancer Cells Remain Sensitive to the Auger Electron–Emitting Radiotherapeutic Agent <sup>111</sup>In-NLS-Trastuzumab and Are Radiosensitized by Methotrexate / D. L. Costantini, K. Bateman, K. McLarty [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2008. – Vol. 49. – № 9. – P. 1498-1505.
254. Patent US10808032B2. Biological materials related to HER3 / C. Knuehl, B. Hock, R. Hofmeister, [et al.]. – 2020.
255. HER3 specific biodistribution and tumor uptake of <sup>89</sup>Zr-MSB0010853 visualized by real-time and non-invasive PET imaging / F.-J. Warnders, A. G. T. van Scheltinga, C. Knuehl [et al.] // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2017.
256. Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR / D. A. Ferraro, N. Gaborit, R. Maron [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110. – № 5. – P. 1815-1820.

257. Persistent elimination of ErbB-2/HER2-overexpressing tumors using combinations of monoclonal antibodies: Relevance of receptor endocytosis / T. Ben-Kasus, B. Schechter, S. Lavi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106. – № 9. – P. 3294-3299.
258. Examination of HER3 targeting in cancer using monoclonal antibodies / N. Gaborit, A. Abdul-Haia, M. Mancini [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112. – № 3. – P. 839-844.
259. Patritumab deruxtecan (HER3-DXd), a novel HER3 directed antibody drug conjugate, exhibits in vitro activity against breast cancer cells expressing HER3 mutations with and without HER2 overexpression / K. Koyama, H. Ishikawa, M. Abe [et al.] // *PLOS ONE*. – 2022. – Vol. 17. – № 5. – P. e0267027.
260. HERTHENA-Lung01: a phase II study of patritumab deruxtecan (HER3-DXd) in previously treated metastatic EGFR-mutated NSCLC / H. A. Yu, J. C.-H. Yang, H. Hayashi [et al.] // *Future Oncology*. – 2023.
261. Van Hoecke L. How mRNA therapeutics are entering the monoclonal antibody field / L. Van Hoecke, K. Roose // *Journal of Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 54.
-

## БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была поддержана грантом Минобрнауки РФ RFMEFI57716X0217 «Разработка новых терапевтических VHH-антител к рецептору HER3» (2016–2019 г.), стипендией Президента РФ для молодых ученых (2021–2022 г.) и софинансирована ЗАО «Биокад». Благодарю Научный парк СПбГУ за помощь в организации экспериментов по масс-спектрометрии, SPC Facility EMBL Hamburg за организацию экспериментов по скринингу условий кристаллизации и ЦКП «Геномика» СО РАН за проведение экспериментов по NGS секвенированию.

Я благодарен всем коллегам и соавторам из компании «Биокад», которые вовлекли меня в исследования антител лам: А. И. Афремовой, А. В. Евстратьевой, М. С. Дрожжачих, Е. А. Кренделевой, А. К. Владимировой, Т. А. Неманкину, В. М. Екимовой, М. И. Ломовской, С. Р. Евдокимову, Ю. В. Путинцевой, А. Б. Улитину, П. А. Яковлеву и Р. А. Иванову. Благодарю А. Г. Габибова и коллег из ИБХ РАН, В. М. Украинскую, А. В. Степанова, А. Э. Мамедова, Я. А. Ломакина, Л. А. Овчинникову, Ю. А. Мокрушину, С. С. Терехова, А. А. Белогурова и И. С. Смирнова, у которых мне посчастливилось научиться многим аспектам практической молекулярной иммунологии. Первому опыту макромолекулярной кристаллографии я обязан В. Ламзину и Й. Каллио из EMBL Hamburg и А. Г. Габдулхакову, А. Д. Никулину и М. Б. Гарбер из Института белка РАН. Благодарю за помощь и поддержку моих коллег и соавторов, А. Н. Юденко, И. Н. Тертерова, Н. А. Беседину, А. А. Свиринову, С. В. Шмакова, А. С. Букатина, В. В. Высочинскую, Н. А. Князева и Ф. В. Моисеенко, вместе с которыми мне довелось развивать биологическое направление исследований в лаборатории М. В. Дубины в Алферовском университете. Благодарю моих бывших и нынешних студентов, общение с которыми всегда было стимулирующим: Н. П. Родину, А. А. Сахарова, Г. А. Лелейтнера, А. М. Лисаченко, И. С. Воропаева, Я. Г. Каюмова, А. А. Вронскую, Р. В. Сметанина, А. И. Калганову и А. Д. Микушину.

Я искренне благодарю профессора Ольгу Валерьевну Шамову, без которой данная работа была бы невозможной, за наставничество и поддержку.

Спасибо моим родителям за терпение и моей жене за то, что она не раз прочитала этот текст и помогла сделать его немного более понятным.

*Май 2023 года*

*Чешме*