



Разработка методик контроля качества химического предшественника – рекомбинантного белка с анкириновыми повторами для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2 в злокачественных опухолях

Р. Н. Варвашеня^{1,2}✉, Г. Е. Янович^{1,2}, Е. В. Плотников², А. А. Шульга^{2,3},
Е. В. Коновалова^{2,3}, Р. Х. Зиганшин³, С. М. Деев^{2,3}, К. С. Бразовский²,
М. В. Белоусов^{1,2}, В. И. Чернов^{2,4}, М. С. Ларькина^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России). 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (НИ ТПУ). 634050, Россия, г. Томск, проспект Ленина, д. 30

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН). 117997, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

⁴ Научно-исследовательский институт онкологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (НИИ онкологии Томского НИМЦ). 634009, Россия, г. Томск, Кооперативный переулок, д. 5

✉ Контактное лицо: Варвашеня Руслан Николаевич. E-mail: mr.varvashenya@mail.ru

ORCID: Р. Н. Варвашеня – <https://orcid.org/0009-0002-4282-3198>;
Г. Е. Янович – <https://orcid.org/0009-0006-0383-3296>;
Е. В. Плотников – <https://orcid.org/0000-0002-4374-6422>;
А. А. Шульга – <https://orcid.org/0000-0003-3425-0828>;
Е. В. Коновалова – <https://orcid.org/0000-0002-4187-376X>;
Р. Х. Зиганшин – <https://orcid.org/0000-0002-7931-519X>;
С. М. Деев – <https://orcid.org/0000-0002-3952-0631>;
К. С. Бразовский – <https://orcid.org/0000-0002-4779-9820>;
М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>;
В. И. Чернов – <https://orcid.org/0000-0001-8753-7916>;
М. С. Ларькина – <https://orcid.org/0000-0003-1176-2441>.

Статья поступила: 16.03.2025

Статья принята в печать: 12.09.2025

Статья опубликована: 12.09.2025

Резюме

Введение. Сверхэкспрессия рецептора HER2 ассоциирована с агрессивным течением онкологических заболеваний и неблагоприятным прогнозом. Традиционная иммуногистохимическая диагностика имеет ряд ограничений, включая инвазивность, невозможность оценки гетерогенности опухоли и тотального распространения процесса. Перспективной альтернативой является радионуклидная визуализация с использованием каркасных таргетных белков DARPIn G3. По результатам доклинических исследований препарат ^{99m}Tc-[Tc]-G3-(G₃S)₃C был предложен для проведения I фазы клинических исследований. Экспериментальный препарат представляет собой стерильный лиофилизат химического предшественника в одном флаконе и должен соответствовать требованиям ОФС 1.11.0005 «Химические предшественники для радиофармацевтических лекарственных препаратов» и ОФС 1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» Государственной фармакопеи РФ XV издания.

Цель. Целью настоящего исследования была разработка подходов и методик контроля качества белка DARPIn G3-(G₃S)₃C, входящего в состав разработанной композиции лиофилизата химических предшественников для получения ^{99m}Tc-содержащего препарата для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2 в злокачественных опухолях

Материалы и методы. Объектом исследования явился лиофилизат, содержащий DARPIn G3-(G₃S)₃C со вспомогательными веществами. Для регистрации масс-спектров белка использовали ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометром, снабженным

© Варвашеня Р. Н., Янович Г. Е., Плотников Е. В., Шульга А. А., Коновалова Е. В., Зиганшин Р. Х., Деев С. М., Бразовский К. С., Белоусов М. В., Чернов В. И., Ларькина М. С., 2025

© Varvashenya R. N., Yanovich G. E., Plotnikov E. V., Shulga A. A., Konovalova E. V., Zigashin R. H., Deev S. M., Brazovskii K. S., Belousov M. V., Chernov V. I., Larkina M. S., 2025

источником ионизации электрораспылением. Вертикальный электрофорез с натрия додецилсульфатом (SDS) в полиакриламидном геле с концентрацией акриламида 15 % проводили при напряжении 110 В в течение 2 ч. В качестве красящего раствора использовали раствор кумасси В-250. Тандемную масс-спектрометрию проводили с помощью системы ВЭЖХ с масс-спектрометром посредством наноэлектроспрейного источника. При корреляции аминокислотной последовательности карбамидометилирование Cys, деамидирование Asn/Gln и окисление Met учитывались как переменные модификации. Для определения количества белка в лиофилизате был использован спектрофотометрический метод при длине волны 280 нм. Валидационная оценка разработанной методики проводилась в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи РФ XV издания.

Результаты и обсуждение. Подлинность и чистота DARPin G3-(G₃S)₃C была подтверждена с использованием ВЭЖХ-МС. Молекулярная масса мономера согласуется с расчетной и составила 14075,9 Да с точностью до 0,5 Да, чистота белка была близка к 100 %. Для определения подлинности и чистоты DARPin G3-(G₃S)₃C методом электрофореза в полиакриламидном геле предложено использовать 2 мкг и 20 мкг белка соответственно. Рассчитанная молекулярная масса белка составила 13,58 ± 0,82 кДа. В лиофилизате содержание примеси гомодимера, определенной электрофорезом в полиакриламидном геле, не превышало 3 %, другие белковые примеси наблюдались в количестве не более 1 %. Чистота белка, установленная методом ВЭЖХ-МС/МС для анализа первичной структуры, составила 98 %. Перекрытие аминокислотной последовательности целевого белка с идентифицированными пептидными фрагментами составило 100 %. В результате анализа гидролизата белка было идентифицировано более 700 его пептидных фрагментов (значение -10LogP – более 20). Разработанная методика УФ-спектрофотометрии соответствует валидационным требованиям и позволяет определять количественное содержание белка DARPin G3-(G₃S)₃C в лиофилизате ±10 % от номинального содержания.

Заключение. Для определения показателя «подлинность» нового химического предшественника белка DARPin G3-(G₃S)₃C в составе лиофилизата для получения ^{99m}Tc-содержащего препарата для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2 в злокачественных опухолях были предложены методики масс-спектрометрии, пептидного картирования, электрофореза в полиакриламидном геле. Для показателя «родственные примеси» – методика электрофореза в полиакриламидном геле. Для определения показателя «количественное определение» – методика УФ-спектрофотометрии.

Ключевые слова: злокачественные опухоли, HER2, радионуклидная диагностика, DARPin G3, контроль качества

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. А. Шульга и М. С. Ларькина – концептуализация. К. С. Бразовский, М. В. Белоусов, М. С. Ларькина – методология. Р. Н. Варвашеня, Г. Е. Янович, Е. В. Коновалова, Р. Х. Зигашин – проведение исследования. М. В. Белоусов, В. И. Чернов, М. С. Ларькина, Е. В. Плотников, К. С. Бразовский – курирование данных. Р. Н. Варвашеня, Г. Е. Янович, Е. В. Плотников, А. А. Шульга, Е. В. Коновалова, Р. Х. Зигашин, М. В. Белоусов, В. И. Чернов, М. С. Ларькина – подготовка рукописи. Р. Н. Варвашеня, М. С. Ларькина, Р. Х. Зигашин – рецензирование и редактирование рукописи. М. С. Ларькина, В. И. Чернов, М. В. Белоусов, А. А. Шульга, К. С. Бразовский – руководство.

Финансирование. Работа была выполнена за счет финансирования проекта ТПУ (Приоритет-2030-НИП/ИЗ-104-375/423-2023).

Для цитирования: Варвашеня Р. Н., Янович Г. Е., Плотников Е. В., Шульга А. А., Коновалова Е. В., Зиганшин Р. Х., Деев С. М., Бразовский К. С., Белоусов М. В., Чернов В. И., Ларькина М. С. Разработка методик контроля качества химического предшественника – рекомбинантного белка с анкириновыми повторами для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2 в злокачественных опухолях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(4). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2043>

Development of quality control techniques of chemical precursor – recombinant protein with ankyrin repeats for radionuclide imaging of HER2 overexpression in malignant tumors

Ruslan N. Varvashenya^{1,2}✉, Gleb E. Yanovich^{1,2}, Evgeny V. Plotnikov², Aleksey A. Shulga^{2,3}, Elena V. Konovalova^{2,3}, Rustam H. Zigashin³, Sergey M. Deev^{2,3}, Konstantin S. Brazovskii², Mikhail V. Belousov^{1,2}, Vladimir I. Chernov^{2,4}, Maria S. Larkina^{1,2}

¹ Siberian State Medical University, SSMU. 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia

² National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk Polytechnic University (TPU). 30, prospekt Lenina, Tomsk, 634050, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry. 16/10, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117997, Russia

⁴ Cancer Research Institute is a subdivision of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences" (Tomsk NRMС). 5, Kooperativny pereulok, Tomsk, 634009, Russia

✉ **Corresponding author:** Ruslan N. Varvashenya. **E-mail:** mr.varvashenya@mail.ru

ORCID: Ruslan N. Varvashenya – <https://orcid.org/0009-0002-4282-3198>;

Gleb E. Yanovich – <https://orcid.org/0009-0006-0383-3296>;

Evgeny V. Plotnikov – <https://orcid.org/0000-0002-4374-6422>;

Aleksey A. Shulga – <https://orcid.org/0000-0003-3425-0828>;

Elena V. Konovalova – <https://orcid.org/0000-0002-4187-376X>;
Rustam H. Zigashin – <https://orcid.org/0000-0002-7931-519X>;
Sergey M. Deev – <https://orcid.org/0000-0002-3952-0631>;
Konstantin S. Brazovskii – <https://orcid.org/0000-0002-4779-9820>;
Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>;
Vladimir I. Chernov – <https://orcid.org/0000-0001-8753-7916>;
Maria S. Larkina – <https://orcid.org/0000-0003-1176-2441>.

Received: 16.03.2025

Accepted: 12.09.2025

Published: 12.09.2025

Abstract

Introduction. Overexpression of the HER2 receptor is associated with aggressive cancer progression and poor prognosis. Traditional immunohistochemical diagnostics have a number of limitations, including invasiveness, inability to assess tumor heterogeneity, and total spread of the process. A promising alternative is radionuclide imaging using targeted scaffold DARPIn G3 proteins. Based on the results of preclinical studies, the drug $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc}]\text{-G3-(G}_3\text{S)}_3\text{C}$ has been proposed for Phase I clinical trials. The experimental drug is a sterile lyophilizate of a chemical precursor in a single vial and must comply with the requirements of OFS 1.11.0005 "Chemical Precursors for Radiopharmaceuticals" and OFS 1.7.1.0007.15 "Medicinal Products Obtained by Recombinant DNA Methods."

Aim. The aim of the present study was to develop approaches and techniques for quality control of DARPIn G3-(G₃S)₃C protein included in the developed composition of chemical precursor lyophilizate for preparation of ^{99m}Tc -containing preparation for radionuclide imaging of HER2 overexpression in malignant tumors

Materials and methods. A lyophilizate containing DARPIn G3-(G₃S)₃C with excipients was prepared for quality control. HPLC with a tandem mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source was used to record mass spectra. Vertical electrophoresis with SDS in a heterogeneous buffer system was carried out in a polyacrylamide gel with an acrylamide concentration of 15 % at 110 V for 2 hours. Coomassie B-250 solution was used as the dye solution. Peptide mapping was performed using an HPLC system with a mass spectrometer via a nano-electrospray source. When correlating the amino acid sequence, carbamidomethylation of Cys, deamidation of Asn/Gln and oxidation of Met were counted as variable modifications. UV spectrophotometry was performed to determine the Quantification index at a wavelength of 280 nm. Validation evaluation of the developed method was carried out in accordance with the requirements of OFS.1.1.0012 "Validation of analytical methods".

Results and discussion. The authenticity and purity of DARPIn G3-(G₃S)₃C was confirmed using HPLC-MS. The purity of the protein was close to 100 %. Application of 2 µg of protein for electrophoresis in polyacrylamide gel showed a distinct stain allowing the authenticity of DARPIn G3-(G₃S)₃C to be established. To determine the homodimer impurity, 10 µg of protein should be applied. The purity of the protein established by the peptide mapping method is 98 %. More than 700 variations of peptide fragments were identified by protein hydrolysate analysis. The value of -10LogP was more than 20. The developed UV-visible spectrophotometry technique meets the validation requirements and allows the quantification of DARPIn G3-(G₃S)₃C protein in the lyophilizer $\pm 10\%$ of the nominal content.

Conclusion. To determine the "Genuineness" of a new chemical precursor of DARPIn G3-(G₃S)₃C protein in the lyophilizate for the preparation of ^{99m}Tc -containing preparation for radionuclide imaging of HER2 overexpression in malignant tumors the following methods were proposed: mass spectrometry, peptide mapping, electrophoresis in polyacrylamide gel. For the indicator "Related impurities" – the technique of electrophoresis in polyacrylamide gel. For the indicator "Quantitative determination" the method of UV-spectrophotometry.

Keywords: malignant tumors, HER2, radionuclide diagnostics, DARPIn G3, quality control

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Aleksey A. Shulga and Maria S. Larkina – conceptualization. Konstantin S. Brazovskii, Mikhail V. Belousov, Maria S. Larkina – methodology. Ruslan N. Varvashenya, Gleb E. Yanovich, Elena V. Konovalova, Rustam H. Zigashin – conducting the study. Mikhail V. Belousov, Vladimir I. Chernov, Maria S. Larkina, Evgeny V. Plotnikov, Konstantin S. Brazovskii – data supervision. Ruslan N. Varvashenya, Gleb E. Yanovich, Evgeny V. Plotnikov, Aleksey A. Shulga, Elena V. Konovalova, Rustam H. Zigashin, Mikhail V. Belousov, Vladimir I. Chernov, Maria S. Larkina – preparation of the manuscript. Ruslan N. Varvashenya, Maria S. Larkina, Rustam H. Zigashin – reviewing and editing of the manuscript. Maria S. Larkina, Vladimir I. Chernov, Mikhail V. Belousov, Aleksey A. Shulga, Konstantin S. Brazovskii – guidance.

Funding. The work was carried out using funding from the the National Research Tomsk Polytechnic University project (Priority-2030-NIP/IZ-104-375/423-2023).

For citation: Varvashenya R. N., Yanovich G. E., Plotnikov E. V., Shulga A. A., Konovalova E. V., Zigashin R. H., Deev S. M., Brazovskii K. S., Belousov M. V., Chernov V. I., Larkina M. S. Development of quality control techniques of chemical precursor – recombinant protein with ankyrin repeats for radionuclide imaging of HER2 overexpression in malignant tumors. *Drug development & registration*. 2025;14(4). (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2043>

ВВЕДЕНИЕ

Рецепторы семейства эпидермального фактора роста представляют собой тирозиновую протеинкиназу и отвечают за процессы деления, дифференцирования и апоптоза в нормальных и опухолевых клетках [1, 2]. Рецептор HER2 (человеческий эпидермальный фактор роста типа 2) часто демонстрирует сверхэкспрессию при различных онкологических заболеваниях. Это связано с повышенной агрессивностью опухолей и неблагоприятным прогнозом для пациентов [3]. Для применения терапии зарегистрированными HER2-таргетными препаратами необходимо определение уровня экспрессии рецептора. В случае недостаточно высокой экспрессии мишени противоопухолевый эффект может отсутствовать, а риск побочных эффектов для пациента повышается. Одним из методов диагностики уровня экспрессии HER2 является иммуногистохимический метод, который основан на биопсии [1, 4]. Такой метод имеет ряд недостатков, среди которых невозможность определения распространенности опухолевого процесса, высокая степень гетерогенности экспрессии HER2 в опухолевой ткани, трудности забора биопсийных образцов при множественных метастазах [5].

В качестве альтернативы определению HER2-статуса у пациентов было предложено использовать радионуклидную молекулярную визуализацию экспрессии HER2 *in vivo* [6, 7].

Наиболее перспективными в этом плане являются каркасные белки (или скаффолды), которые по сравнению с анти-HER-моноклональными антителами (трастузумабом, пертузумабом и др.) обеспечивают более высокую контрастность изображения в короткие сроки (2–4 ч после инъекции) [8, 9].

Перспективными для разработки таргетных радиофармацевтических лекарственных средств для визуализации молекулярных мишеней считаются рекомбинантные белки с анкириновыми повторами (DARPin) [10–12]. DARPin – это сконструированные белки с высокой аффинностью и стабильностью, структурная основа которых состоит из множества анкириновых повторов. Каждый такой повтор, как правило, включает 33 аминокислотных остатка, формирующих β -поворот и пару антипараллельных α -спиралей. При объединении повторы образуют правозакрученную соленоидную структуру: ее внутренняя часть представляет собой гидрофобное ядро, а внешняя поверхность обладает гидрофильными свойствами, обеспечивая взаимодействие с растворителем [13].

Небольшой размер молекулы DARPin (14–18 кДа) облегчает локализацию в опухоли, что является преимуществом при разработке препаратов для визуализации. Также стоит отметить стабильность DARPin в широком диапазоне pH и температуры, что позволяет использовать широкий спектр методов меченя радионуклидами [14]. Ранее Goldstein et al. показали способность DARPin, меченных ^{111}In и ^{125}I , визуализировать экспрессию HER2 в ксенотрансплантатах опухолей человека у мышей [15]. Дальнейшие исследо-

вания показали, что вариант DARPin G3 является лучшим вариантом для разработки агентов для радионуклидной визуализации HER2-экспрессии [16].

В I фазе клинических исследований был изучен DARPin G3, меченный трикарбонилем одновалентного технеция, – $^{99\text{m}}\text{Tc}[\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ [17]. Было установлено, что применение $^{99\text{m}}\text{Tc}[\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ для радионуклидной визуализации безопасно при воздействии на пациентов. С помощью диагностической визуализации с применением $(\text{HE})_3\text{-G3}$, меченного $^{99\text{m}}\text{Tc}$, удалось четко визуализировать HER2-экспрессирующий рак молочной железы уже через 2–4 ч после введения препарата. Метод позволил достоверно дифференцировать HER2-положительные и HER2-отрицательные опухоли. Недостатками этого экспериментального радиофармпрепарата для клинического применения являются сложная технология получения с последующей хроматографической очисткой от радиохимических примесей. В следующих исследованиях по улучшению DARPin G3 для меченя технецием-99м [18] был создан вариант DARPin G3 с хелатором глицил-глицил-глицил-серил-цистеином (GGGSC), соединенным посредством дважды повторяющегося линкера триглицил-серил- $(\text{G}_3\text{S})_2$ на C-концевой последовательности белка. Этот вариант белка получил наименование $\text{G3-(G}_3\text{S)}_3\text{C}$. По результатам доклинических исследований предложенная структура, меченная технецием-99м, показала способность специфически и высокоаффинно связываться с HER2-экспрессируемыми опухолевыми клетками человека *in vitro*, специфически накапливаться в ксенотрансплантатах человеческих опухолей с HER2-экспрессией *in vivo* [19]; также $^{99\text{m}}\text{Tc}[\text{Tc-G3-(G}_3\text{S)}_3\text{C}$ был предложен для пилотных клинических исследований (NCT05923268).

Экспериментальный препарат представляет собой стерильный лиофилизат химического предшественника в одном флаконе, содержащий необходимое количество белка $\text{G3-(G}_3\text{S)}_3\text{C}$ и вспомогательные вещества [20], при добавлении к которому натрия пертехнетата ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) с последующей инкубацией при нагревании и стерилизацией получается готовый для использования раствор.

Требования к качеству химического предшественника регламентируются ОФС 1.11.0005 «Химические предшественники для радиофармацевтических лекарственных препаратов» Государственной фармакопеи РФ XV издания. Идентификация, испытание на химическую чистоту и анализы должны проводиться по валидированным фармакопейным аналитическим методикам с использованием квалифицированного оборудования.

Кроме того, вариант $\text{G3-(G}_3\text{S)}_3\text{C}$ – это белок, полученный методом рекомбинантной ДНК, контроль качества которого должен также проводиться с соблюдением требований ОФС 1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Целью исследования явилась разработка подходов и методик контроля качества белка $\text{G3-(G}_3\text{S)}_3\text{C}$, входящего в состав разработанной композиции лио-

филизата химического предшественника для получения ^{99m}Tc -содержащего препарата для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2 в злокачественных опухолях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и характеристика протеина

Нуклеотидная последовательность гена DARPIn G3 была синтезирована на основе данных аминокислотной структуры, доступной в базе данных PDB (идентификатор 2JAB). Для оптимизации кодонного состава с учетом высокой экспрессии в *Escherichia coli* использовалась программа DNABuilder с открытым доступом.

Ген собрали методом ПЦР на основе синтетических олигонуклеотидов (длина 50 н.о.) с частично комплементарными участками. Экспрессию белка G3-(G₃S)₃C провели в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen-EMD Millipore, США), получив С-концевые химерные белки, включающие модифицированный SUMO-домен, сшитый с убиквитином [21], так же, как описано в [22].

Аминокислотная последовательность для G3-(G₃S)₃C была следующей: DLGKLLAARAGQDDEVRI LMANGADVNAKDEYGLPLYLATAHGHLEIVEVLLNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDI SIGNGNEDLAEILQKLNKGGSGGGSGGGSC. Расчетная молекулярная масса составила 13,83 Да.

Лиофилизат, включающий смесь G3-(G₃S)₃C, D-маннит, ПЭГ-4000, дигидрат хлорида олова (II), глюконат натрия, тетранатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты и фосфатный буфер, был приготовлен в соответствии с ранее описанной методикой [20].

Хромато-масс-спектрометрия

Масс-спектры G3-(G₃S)₃C регистрировали на системе ВЭЖХ LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), сопряженной с тандемным масс-спектрометром QTRAP 3200 (AB SCIEX, Канада), оснащенный источником электрораспылительной ионизации. Разделение проводили на аналитической колонке Macherey-Nagel NUCLEODUR C18 Gravity (50 × 2 мм, 3 мкм) с предколоночным картриджем при температуре 40 °С. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл.

Подвижная фаза включала два компонента: элюент А – 0,1%-й водный раствор муравьиной кислоты; элюент В – ацетонитрил.

Хроматографию выполняли в изократическом режиме с 50 % элюента В в течение 5 мин, после чего переходили к градиентному промыванию: 5,5–6 мин – 50–100 % В; 6–7 мин – 100 % В; 7–8 мин – возврат к 50 % В. Скорость потока поддерживали на уровне 0,2 мл/мин.

Для ионизации в положительном режиме (M + H)⁺ использовали следующие параметры: напряжение на капилляре – 2,8 кВ; потенциал декластеризации – 20 В; входной потенциал – 9 В. Осушающий газ (азот) подавали при температуре 300 °С.

Качественный анализ проводили методом полного сканирования ионов в диапазоне *m/z* 100–1700 с использованием первого квадруполя (Q1). Оптимальное время сканирования составило 0,5 с.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Приготовление испытуемого раствора. Лиофилизат, содержащий 3,3 мг белка G3-(G₃S)₃C и вспомогательные вещества, растворяли в 1 мл воды очищенной при комнатной температуре в течение 10 мин, периодически перемешивая на вортексе. Из полученного раствора взяли аликвоту 5 мкл, довели до 82 мкл водой очищенной.

Приготовление разделяющего геля. 5 мл раствора, содержащего 30%-й N,N'-метилен-бисакриламида (АКА), смешивали с компонентами смеси в соответствии с пропорциями, указанными в таблице 1. Компоненты добавляли последовательно, как указано в таблице. После внесения персульфата аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (TEMED) смесь тщательно перемешивали и сразу же заливали в пространство между стеклянными пластинами гелевой ячейки, оставляя место для нанесения концентрирующего геля. Гель оставляли в вертикальном положении до полной полимеризации.

Таблица 1. Приготовление разделяющего геля

Table 1. Preparation of separating gel

Компоненты смеси Mixture components	Объем компонента Component volume
30 % АКА (ООО «Медиген», Россия) 30 % АКА (LLC "Medigen", Russia)	2,5 мл 2.5 ml
Вода очищенная Purified water	1,124 мл 1.124 ml
1,5 М трис-НСI (ООО «Компания Хеликон», Россия), рН 8,8 1.5 M Tris-HCl (LLC "Helikon Company", Russia), pH 8.8	1,25 мл 1.25 ml
10 % додецилсульфата натрия (SDS) (ООО «Медиген», Россия) 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS) (LLC "Medigen", Russia)	50 мкл 50 µl
10 % персульфата аммония (ООО «Медиген», Россия) 10 % ammonium persulfate (LLC "Medigen", Russia)	50 мкл 50 µl
TEMED (ООО «Компания Хеликон», Россия) TEMED (LLC "Helikon Company", Russia)	5 мкл 5 µl

Приготовление концентрирующего геля. Для приготовления концентрирующего геля 2,5 мл раствора 30%-го АКА смешивали с компонентами смеси, следуя последовательности, приведенной в таблице 2. После добавления персульфата аммония и TEMED смесь тщательно перемешивали и сразу заливали в пространство между стеклянными пластинами гелевой ячейки. В верхнюю часть геля помещали гребенку для формирования лунок. Гель оставляли в вер-

тикальном положении до завершения полимеризации, после чего гребенку аккуратно извлекали.

Методика. Камеры заполняли электродным буфером: трис-НСI (ООО «Компания Хеликон», Россия), глицин («Медиген», Россия), SDS (ООО «Медиген», Россия), вода деминерализованная. После чего в ячейку, сформированную гребенкой, помещали 7 мкл маркера молекулярной массы PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США), в соседние ячейки помещали 2 и 20 мкг DARPin G3-(G₃S)₃C. Электрофорез проводили с помощью WIX-easyPRO2 Mini Easy (WIX Technology, Китай) при напряжении 110 В в течение 2 ч. После завершения электрофореза положение полосы бромфенолового синего, соответствующей электрофоретическому фронту, отмечали с помощью надрезов-меток. Гель фиксировали в 10%-й трихлоруксусной кислоте (ТХУ) в течение часа, окрашивали в красящем растворе кумасси В-250 в течение 45 мин. Излишки красителя смывали раствором, содержащим 7 % ледяной уксусной кислоты, 10 % изопропанола в воде, в течение 12 ч.

Таблица 2. Приготовление концентрирующего геля

Table 2. Preparation of concentrating gel

Компоненты смеси Mixture components	Объем компонента Component volume
30 % АКА (ООО «Медиген», Россия) 30 % АКА (LLC "Medigen", Russia)	0,325 мл 0,325 ml
Вода очищенная Purified water	1,5 мл 1.5 ml
5,5 М трис-НСI (ООО «Компания Хеликон», Россия), рН 6,8 5.5 M Tris-HCl (LLC "Helikon Company", Russia), pH 6.8	0,625 мл 0,625 ml
10 % додецилсульфата натрия (SDS) (ООО «Медиген», Россия) 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS) (LLC "Medigen", Russia)	25 мкл 25 µl
10 % персульфата аммония (ООО «Медиген», Россия) 10 % ammonium persulfate (LLC "Medigen", Russia)	25 мкл 25 µl
TEMED (ООО «Компания Хеликон», Россия) TEMED (LLC "Helikon Company", Russia)	2,5 мкл 2,5 µl

Анализ геля проводили на белой подложке с помощью программы GelAnalyzer (версия 23.1.1 для Windows by Istvan Lazar Jr., PhD, and Istvan Lazar Sr., PhD, CsC.). Молекулярную массу белка G3-(G₃S)₃C определяли по сравнению его подвижности с подвижностью белков-маркеров. Для этого измеряли расстояния пробега для каждой полосы белков (маркеров и испытуемого образца) от вершины разделяющего геля до середины полосы. Определяли отношение расстояния пробега каждого белка к расстоянию пробега фронта красителя (R_f). Строили график зависимости логарифма относительных молекулярных масс стандартов белков-маркеров от значения R_f.

ВЭЖХ-МС/МС для анализа первичной структуры

Анализ DARPin G3-(G₃S)₃C методом ВЭЖХ-МС/МС для анализа первичной структуры проводили с помощью системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) UltiMate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), с масс-спектрометром Orbitrap Tribrid Lumos (Thermo Fisher Scientific) с наноэлектроспрейным источником. Пробоподготовка описана ранее [23], при этом время ферментативно-го гидролиза составляло до 16 ч.

Образцы загружали на предколонку 50 × 0,1 мм, заполненную сорбентом ReproSil-Pur 200 C18-AQ, 5 мкм (Dr. Maisch HPLC GmbH, Германия), с размером пор 120 Å. Пептиды растворяли в смеси, содержащей 2 % ацетонитрила, 98 % воды и 0,1 % трифторуксусной кислоты. Разделение проводили на кварцевой колонке 300 × 0,1 мм с эмиттером, изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (Sutter, США) и заполненной сорбентом Reprosil Pur C18 AQ, 1,9 мкм, 120 Å (Dr. Maisch HPLC GmbH, Германия), при скорости потока 4,2 мкл/мин.

Для элюирования использовали два растворителя: А (99,9 % воды и 0,1 % муравьиной кислоты); Б (19,9 % воды, 0,1 % муравьиной кислоты и 80 % ацетонитрила).

Пептиды разделяли линейным градиентом при скорости потока 500 нл/мин. Анализ и статистическую обработку полученных масс-спектров проводили с помощью программы PEAKS Studio 11 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада) [24]. При сопоставлении аминокислотных последовательностей с базой данных учитывали следующие пост-трансляционные модификации: карбамидометилирование цистеина (Cys); деамидирование аспарагиновой и глутаминовой кислот (Asn/Gln); окисление метионина (Met).

Дополнительно учитывали целевую модификацию Cys с брутто-формулой C(9)H(8)N(2)O(2) и моноизотопной массой 204,0641. Уровень ложноположительных идентификаций установили на уровне 0,01, проверяя результаты по реверсной базе данных. В настройках поиска специфичность протеазы была установлена на трипсин (полуспецифичность) с допуском до 3 пропущенных сайтов протеолиза. Допустимое отклонение массы иона-предшественника составляло до 10 м.д., а массы фрагментов – до 0,2 Да.

Количественное определение методом спектрофотометрии

Для приготовления испытуемого раствора с концентрацией 1,65 мг/мл лиофилизат, содержащий 3,3 мг белка G3-(G₃S)₃C со вспомогательными веществами, растворяли в 2 мл фосфатного буфера (0,01 М) при комнатной температуре в течение 10 мин, периодически перемешивая на вортексе.

В качестве раствора сравнения применяли 2 мл 0,01 М фосфатного буфера, содержащего вспомога-

тельные вещества. Стандартный раствор готовили с концентрацией $G3-(G_3S)_3C$ 3,3 мг/мл.

В соответствии с ОФС.1.2.3.0012.15 для высокоочищенных белков допустимо определять концентрацию с использованием удельного показателя поглощения (весового коэффициента). Количество $G3-(G_3S)_3C$ во флаконе рассчитывали с использованием весового коэффициента поглощения [25], который составляет $0,22 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Этот коэффициент отражает оптическую плотность при концентрации 1 г/л (или 1 мг/мл) и толщине слоя 1 см.

Методика. Испытуемый раствор и раствор сравнения выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин. Оптическую плотность испытуемого раствора измеряли в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см при длине волны 280 нм, используя раствор сравнения. Анализ проводили в трех повторениях для обеспечения точности результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка подлинности лекарственных средств, полученных методами рекомбинантной ДНК, является обязательным критерием контроля качества.

Согласно требованиям ОФС.1.7.1.0007.15, для подтверждения подлинности могут применяться различные методы, включая электрофорез в полиакриламидном геле, капиллярный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, ионообменную или обращенно-фазовую хроматографию, иммуноблоттинг и тандемную масс-спектрометрию, сопряженную с ВЭЖХ (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием стандартных образцов, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации. Дополнительно для оценки подлинности может быть использован метод определения специфической активности.

В случае с DARPin $G3-(G_3S)_3C$ для подтверждения подлинности были предложены следующие методы: хромато-масс-спектрометрия, электрофорез в полиакриламидном геле и ВЭЖХ-МС/МС.

Хромато-масс-спектрометрия

Подлинность $G3-(G_3S)_3C$ была подтверждена с использованием ВЭЖХ-МС. Масс-спектр показал, что белок в основном присутствует в форме гомодимера ($M_w = 28149,8 \text{ Да}$) (рисунок 1). Молекулярная масса мономера согласуется с расчетной и составила $14075,9 \text{ Да}$ с точностью до $0,5 \text{ Да}$. Кроме того, анализ чистоты этим методом показал, что чистота белка была близка к 100 %.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Подбор оптимальной концентрации белка $G3-(G_3S)_3C$ для анализа показал, что необходимо наносить 2 мкг белка в соответствующей аликвоте из испытуемого раствора с концентрацией белка $0,2 \text{ мг/мл}$ для определения подлинности. В предлагаемых условиях будет наблюдаться визуально отчетливая компактная полоса белка в полиакриламидном геле. Длина пробега белков маркеров составляла не менее 80 % длины разделяющего геля. Для определения молекулярной массы белка $G3-(G_3S)_3C$ проводили сравнение его относительной подвижности с подвижностью белков-маркеров. Для этого был построен график линейной регрессии логарифма относительных молекулярных масс (M_r) стандартов белков-маркеров к фактору удерживания (R_f). Зависимость их R_f от логарифма молекулярной массы являлась линейной ($r > 0,95$). Молекулярную массу $G3-(G_3S)_3C$ вычисляли обратным логарифмированием (рисунок 2).

Значение R_f белка DARPin $G3-(G_3S)_3C$ составило $0,717 \pm 0,015$. Рассчитанная молекулярная масса равна $13,58 \pm 0,82 \text{ кДа}$ ($n = 4, \text{ RSD} = 10 \%$).

Белок DARPin $G3-(G_3S)_3C$ в своей структуре содержит цистеин на С-конце, поэтому в процессе получения, хранения способен окисляться по тиольной группе цистеина и образовывать дисульфиды белка в форме гомодимера. В связи с этим электрофорез в полиакриламидном геле следует проводить в невосстанавливающих условиях для контролирования предела содержания родственной примеси гомодимера. Для определения примеси гомодимера не-

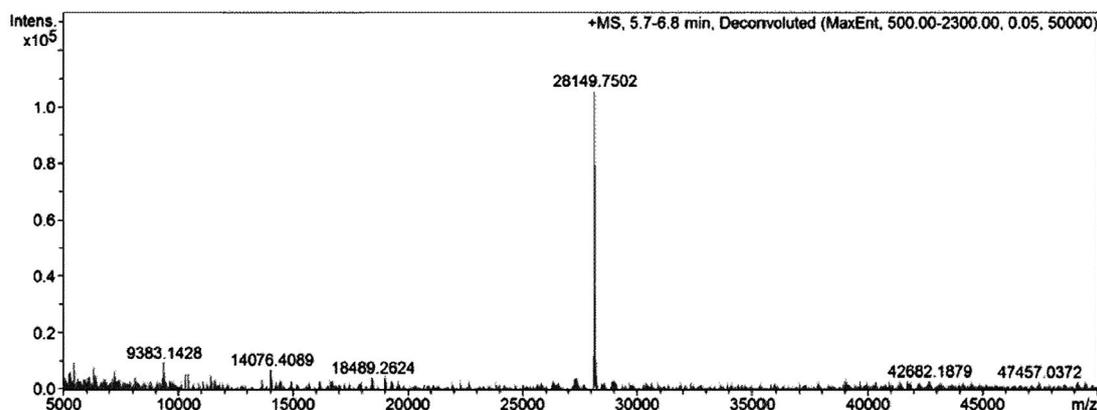


Рисунок 1. Деконволюция масс-спектра DARPin $G3-(G_3S)_3C$

Figure 1. Deconvolution of mass spectra of DARPin $G3-(G_3S)_3C$

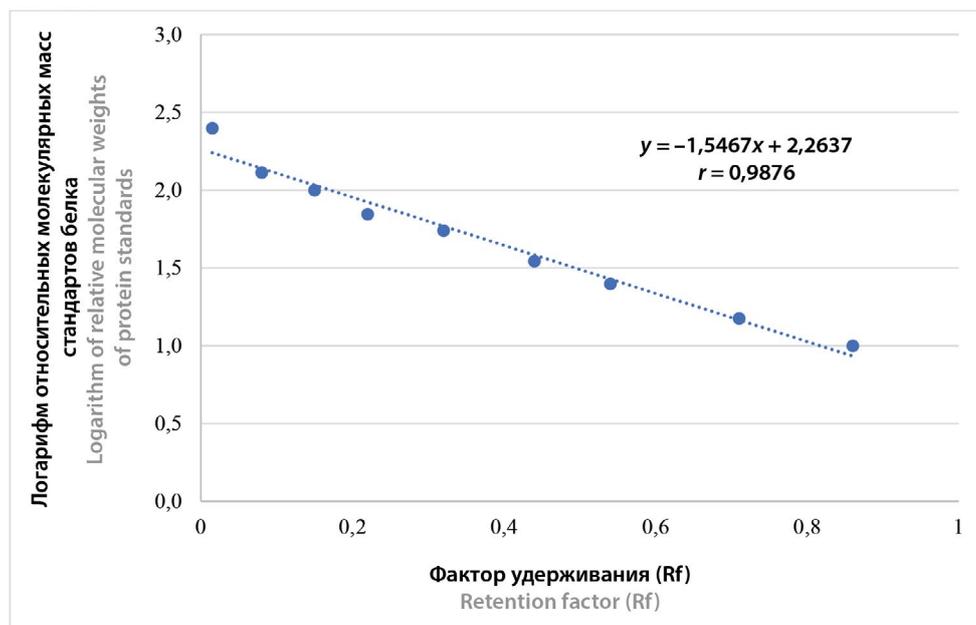


Рисунок 2. График линейной регрессии относительных молекулярных масс (M_r) белка-маркера от значений их факторов удерживания R_f

Figure 2. Linear regression plot of relative molecular masses (M_r) of marker proteins on the values of their retention factors R_f

обходимо помещать не менее 20 мкг белка в аликвоте 6 мкл из исходного раствора. При этом на электрофореграмме также допускается наличие дополнительных полос, кроме основной полосы белка и примеси гомодимера. При анализе пяти серий лиофилизата содержание примеси гомодимера, определенной электрофорезом в полиакриламидном геле, не превышало 3 %, другие белковые примеси наблюдались в количестве не более 1 %. Для разрабатываемого лиофилизата предел содержания примеси гомодимера предложено определить как «не более 5 %». Наличие других белковых примесей предложено контролировать с требованием к качеству «не более 2 %».

ВЭЖХ-МС/МС для анализа первичной структуры

Метод позволяет идентифицировать аминокислотную последовательность белка путем расщепления его до пептидных фрагментов с последующим разделением и идентификацией этих фрагментов в воспроизводимых условиях.

Перед проведением гидролиза пептидных связей в белке $G3-(G_3S)_3C$ провели восстановление дисульфидных связей гомодимера с использованием восстановителя трис(2-карбонилэтил)фосфата (TCEP) с последующим метиламидированием свободного цистеина. Для ферментного расщепления белка до пептидных фрагментов были подобраны оптимальные воспроизводимые условия – инкубация при 85 °C в течение 16 ч в присутствии трипсина.

В результате анализа гидролизата белка было идентифицировано более 700 пептидных фрагментов, основные фрагменты с площадью пика более 10^6 приведены в таблице 3. Перекрытие аминокислотной последовательности целевого белка с идентифицированными пептидными фрагментами составило 100 % (рисунок 3). Значение 10LogP составило более 20 (вероятность случайного совпадения идентифицированного пептида с базой данных составило менее 1 %). Это позволяет идентифицировать индивидуальные пептиды с высокой степенью достоверности.

Содержание предполагаемых примесей других белков составило не более 2 %. Соответственно чистота белка, установленная этим методом, составляет 98 %.

Следовательно, методика ВЭЖХ-МС/МС для определения первичной структуры белка $G3-(G_3S)_3C$ позволяет с высоким процентом перекрытия идентифицировать аминокислотную последовательность и также характеризует чистоту белка.

Количественное определение методом спектрофотометрии

Разработка методики количественного определения белка $G3-(G_3S)_3C$ проводилась в соответствии с требованиями ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка» (метод 1) при длине волны 280 нм. Для расчета содержания белка $G3-(G_3S)_3C$ в лиофилизате был выбран способ расчета через весовой коэффициент поглощения, поскольку белок имеет высокую степень очистки. Содержание белка $G3-(G_3S)_3C$ в лиофилизате должно быть ± 10 % от номинального содержания.



Рисунок 3. Перекрывание аминокислотной последовательности белка DARPin G3-(G₃S)₃C идентифицированными пептидными фрагментами. Аминокислоты обозначены в соответствии с номенклатурой ИЮПАК (приведены буквенные обозначения). Аминокислоты, подвергшиеся модификации в процессе анализа, обозначены красным квадратом («С» – карбамидометилирование) или синим квадратом («D» – деамидирование)

Figure 3. Overlap of the amino acid sequence of DARPin G3-(G₃S)₃C protein with identified peptide fragments. Amino acids are designated according to IUPAC nomenclature (letter designations are given). Amino acids subjected to modification during analysis are indicated by a red square ("C" – carbamidomethylation) or a blue square ("D" – deamidation)

Таблица 3. Основные пептиды, обнаруженные при трипсинолизе DARPin G3-(G₃S)₃C, с площадью пика более 10⁶

Table 3. Major peptides detected by trypsinolysis of DARPin G3-(G₃S)₃C with peak area greater than 10⁶

Пептид Peptide	-10LogP	Молекулярная масса, Да Molecular weight, Da	m/z	Время удерживания, мин Retention time, min	Площадь пика, мин · мВ Peak area, min · mV
HGADVNAQDKFGK	113,77	1385,7	693,8	22,5	11,6 · 10 ⁹
KLLEAAR	105,48	799,5	267,5	20,4	15,5 · 10 ⁸
ILMANGADVNAK	112,51	1215,6	608,8	41,8	75,8 · 10 ⁷
ILMANGADVNAK	110,14	1216,6	609,3	41,8	40,8 · 10 ⁷
ILMANGADVNAK	104,35	1216,6	609,3	41,8	35,3 · 10 ⁷
HGADVNAQDKFGK	102,78	1386,6	347,7	20,6	34,1 · 10 ⁷
HGADVNAQDKFGK	101,15	1386,6	463,2	21,2	34,1 · 10 ⁷
ILMANGADVNAKDEYGLTPLYLAT AHGHLEIVEVLLK	107,38	3991,1	799,2	79,6	33,5 · 10 ⁷
TAFDISIGNGNEDLAEILQK	109,11	2148,1	717,0	69,7	26,3 · 10 ⁷
TAFDISIGNGNEDLAEILQK	113,04	2147,1	716,7	71,2	21,3 · 10 ⁷
ILMANGADVNAK	106,17	1232,6	617,3	38,3	10,8 · 10 ⁷
TAFDISIGNGNEDLAEILQK	100,38	2148,1	1075,0	69,6	10,8 · 10 ⁷
ILMANGADVNAK	107,24	1231,6	616,8	28,7	10,2 · 10 ⁷
IGHLEIAEVLLK	107,33	1333,8	1334,8	68,9	49,4 · 10 ⁶
TAHGHLEIVEVLLK	90,51	1557,9	390,5	67,7	38,4 · 10 ⁶
GNEDLAEILQK	106,44	1228,6	615,3	67,0	37,2 · 10 ⁶
DEYGLTPLYLATAHGHLEIVEVLLK	112,79	2793,5	932,2	69,9	36,2 · 10 ⁶
ILMANGADVNAKDEYGLTPLYLAT AHGHLEIVEVLLK	102,04	4007,1	802,4	70,7	35,7 · 10 ⁶
YLATAHGHLEIVEVLLK	110,42	1905,1	636,0	70,6	23,5 · 10 ⁶
HGADVNAQDKFGKTAFDISIGNG NEDLAEILQK	96,83	3514,7	1172,6	68,7	12,1 · 10 ⁶
EDLAEILQK	92,67	1057,6	529,8	65,5	10,9 · 10 ⁶

Специфичность. Тирозин и фенилаланин в структуре G3-(G₃S)₃C обеспечивают избирательность анализа. Данный метод рекомендуется для включения в нормативную документацию с целью количественного определения этого белка. При этом соли буфера и другие вспомогательные компоненты, входящие в состав лиофилизата, не имеют поглощения при этой длине волны и не влияют на результаты анализа.

Линейность. Линейность методики оценивали путем измерения шести стандартных растворов G3-(G₃S)₃C в диапазоне концентраций от 80 до 120 % (1,95; 1,8; 1,65; 1,5; 1,4 и 1,3 мг/мл). Каждый стандартный раствор анализировали в пяти повторах, после чего рассчитывали среднее значение оптической плотности для дальнейшей оценки линейной зависимости (рисунок 4).

Коэффициент корреляции равен 0,9923 при

$$y = 0,2311 \cdot x - 0,0148,$$

где y – оптическая плотность; x – концентрация (мг/мл), что свидетельствует о линейной зависимости оптической плотности G3-(G₃S)₃C от концентрации G3-(G₃S)₃C в растворе.

Сходимость и внутрилабораторная прецизионность. Сходимость определяли на основании резуль-

татов, полученных при анализе 9 образцов G3-(G₃S)₃C одной серии одним аналитиком в один день. Результаты представлены в таблице 4. Для определения внутрилабораторной прецизионности проводили повторение эксперимента для определения сходимости другим аналитиком лаборатории. Результаты представлены в таблице 4.

Расчетное содержание G3-(G₃S)₃C в лиофилизате составило 3,296 ± 0,032 мг. Коэффициент корреляции составил 0,9923 при уравнении линейной зависимости

$$y = 0,2311 \cdot x - 0,0148,$$

где y – оптическая плотность; x – концентрация (мг/мл). Это подтверждает наличие линейной зависимости между оптической плотностью и концентрацией DARPin G3-(G₃S)₃C в растворе.

Правильность методики оценивали методом добавок. Для этого использовали три модельных раствора с концентрациями 80, 100 и 120 % от номинального значения (всего 9 измерений: по 5 для каждой концентрации). В качестве добавки применяли стандартный раствор G3-(G₃S)₃C с концентрацией 3,3 мг/мл. Рассчитанные коэффициенты вариации не превышали 2 % в диапазоне концентраций 80–120 %, что подтверждает валидность методики по параметру «правильность» (таблица 5).

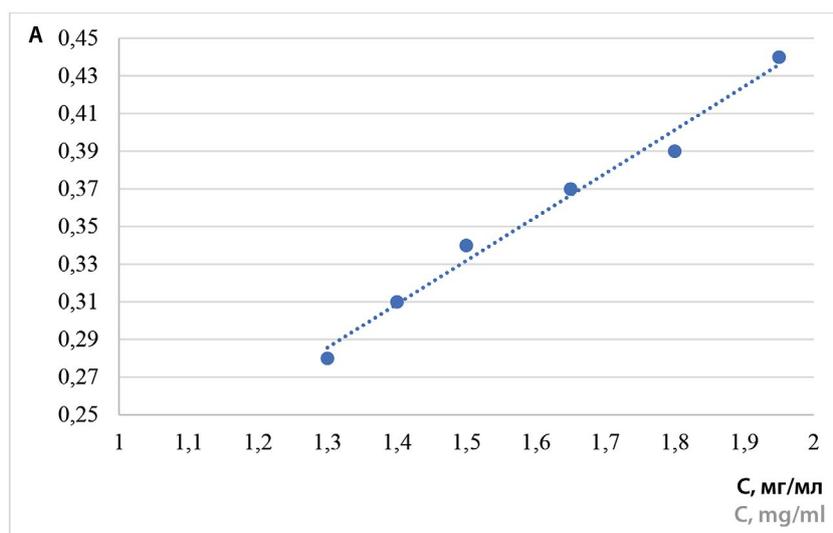


Рисунок 4. График зависимости оптической плотности DARPin G3-(G₃S)₃C от концентрации

Figure 4. Plot of the dependence of the optical density of DARPin G3-(G₃S)₃C on concentration

Таблица 4. Оценка прецизионности методики определения содержания G3-(G₃S)₃C

Table 4. Precision assessment of the methodology for determination of DARPin G3-(G₃S)₃C content

	\bar{x} , мг, в лиофилизате \bar{x} , mg in lyophilizate	f	S	$S_{\bar{x}}$	$RSD_{\bar{x}}$, %	p	$t_{(p, f)}$	$\Delta\bar{x}$
Сходимость Convergence	3,296	8	0,0323	0,0114	0,98	0,95	2,31	0,0249
Внутрилабораторная прецизионность Intra-laboratory precision	3,291	8	0,0265	0,0094	0,81	0,95	2,31	0,204

Примечание. \bar{x} – среднее значение; f – число степеней свободы; S – стандартное отклонение; $S_{\bar{x}}$ – стандартное отклонение среднего результата; $RSD_{\bar{x}}$ – относительное стандартное отклонение среднего результата, выраженное в процентах (коэффициент вариации); p – уровень значимости; $t_{(p, f)}$ – критерий Стьюдента; $\Delta\bar{x}$ – полуширина доверительного интервала неопределенности среднего результата.

Note. \bar{x} – mean value; f – number of degrees of freedom; S – standard deviation; $S_{\bar{x}}$ – standard deviation of the mean result; $RSD_{\bar{x}}$ – relative standard deviation of the mean result, expressed as a percentage (coefficient of variation); p – significance level; $t_{(p, f)}$ – Student's t-test; $\Delta\bar{x}$ – half-width of the confidence interval of the uncertainty of the mean result.

Таблица 5. Результаты определения правильности методики

Table 5. Results of methodology validity determination

Номер модельного раствора Model solution number	Введено белка, % Introduced protein, %	Найдено белка, \bar{x} , мг/мл Protein found, \bar{x} , mg/ml	S	$S_{\bar{x}}$	$RSD_{\bar{x}}$, %	$\Delta\bar{x}$
1	80	2,633	0,025	0,0125	0,95	0,0311
2	100	3,287	0,02	0,01	0,61	0,0249
3	120	3,97	0,015	0,0075	0,38	0,0186

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для оценки показателя «подлинность» нового химического предшественника белка G3-(G₃S)₃C, входящего в состав лиофилизата для получения ^{99m}Tc-содержащего препарата для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2 в злокачественных опухолях, предложены следующие методики: хромато-масс-спектрометрия, ВЭЖХ-МС/МС и электрофорез в полиакриламидном геле. Для определения показателя «родственные примеси» рекомендована методика электрофореза в полиакриламидном геле. Показатель «количественное определение» может быть оценен с помощью УФ-спектрофотометрии.

Установлено, что методика количественного определения соответствует требованиям, предъявляемым к валидации в фармацевтическом анализе, и может быть включена в проект нормативной документации для контроля качества химического предшественника белка G3-(G₃S)₃C в составе лиофилизата, предназначенного для получения нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе ^{99m}Tc.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bartley A. N., Washington M. K., Ventura C. B., Ismaila N., Colasacco C., Benson A. B., Carrato A., Gulley M. L., Jain D., Kakar S., Mackay H. J., Streutker C., Tang L., Troxell M., Ajani J. A. HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2016;140(12):1345–1363. DOI: 10.5858/arpa.2016-0331-CP.
2. Gebhart G., Lamberts L. E., Wimana Z., Garcia C, Emonts P, Ameye L., Stroobants S., Huizing M., Aftimos P., Tol J., Oyen W. J. G., Vugts D. J., Hoekstra O. S., Schröder C. P., Menke-van der Houven van Oordt C. W., Guiot T., Brouwers A. H., Awada A., de Vries E. G. E., Flamen P. Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1): the ZEPHIR trial. *Annals of oncology*. 2016;27(4):619–624. DOI: 10.1093/annonc/mdv577.
3. Tolmachev V. Imaging of HER-2 overexpression in tumors for guiding therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2008;14(28):2999–3019. DOI: 10.2174/138161208786404290.
4. Wolff A. C., Somerfield M. R., Dowsett M., Hammond M. E. H., Hayes D. F., McShane L. M., Saphner T. J., Spears P. A., Allison K. H. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(22):3867–3872. DOI: 10.1200/jco.22.02864.
5. Azhar A., Ahmad E., Zia Q., Rauf M. A., Owais M., Ashraf G. M. Recent advances in the development of novel protein scaffolds based therapeutics. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;102:630–641. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.045.
6. Sörensen J., Velikyan I., Sandberg D., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V., Orlova A., Sandström M., Lubberink M., Olofsson H. Measuring HER2-receptor expression in metastatic breast cancer using [68Ga] ABY-025 Affibody PET/CT. *Theranostics*. 2016;6(2):262.
7. Skuridin V. S., Stasyuk E. S., Bragina O. D., Yusubov M. S., Chernov V. I., Larkina M. S., Zelchan R. V., Rogov A., Sinilkin I., Larionova L. Development of radiopharmaceutical based on mini-antibody for early cancer detection. *Annual Congress of the European-Association-of-Nuclear-Medicine*. 2016;43:465–465.
8. Брагина О. Д., Ларькина М. С., Стасюк Е. С., Чернов В. И., Юсубов М. С., Скуридин В. С., Деев С. М., Зельчан Р. В., Булдаков М. А., Подрезова Е. В., Белоусов М. В. Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченых ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017;16(3):25–33. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-25-33.
9. Брагина О. Д., Чернов В. И., Зельчан Р. В., Синилкин И. Г., Медведева А. А., Ларькина М. С. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(3):125–133. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-3-125-133.
10. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2015;55:489–511.
11. Deyev S. M., Xu T., Liu Y., Schulga A., Konovalova E., Garousi J., Rinne S. S., Larkina M., Ding H., Gräslund T., Orlova A., Tolmachev V., Vorobyeva A. Influence of the Position and Composition of Radiometals and Radioiodine Labels on Imaging of Epcam Expression in Prostate Cancer Model Using the DARPin Ec1. *Cancers*. 2021;13(14):3589. DOI: 10.3390/cancers13143589.
12. Zelchan R., Chernov V., Medvedeva A., Rybina A., Bragina O., Mishina E., Larkina M., Varvashenya R., Fominykh A., Schulga A., Konovalova E., Vorobyeva A., Orlova A., Tashireva L., Deyev S. M., Tolmachev V. Phase I Clinical Evaluation of Designed Ankyrin Repeat Protein [^{99m}Tc]Tc(CO)₃-(HE)₃-Ec1 for Visualization of EpCAM-Expressing Lung Cancer. *Cancers*. 2024;16(16):2815. DOI: 10.3390/cancers16162815.
13. Kobe B, Kajava A.V. When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends in Biochemical Sciences*. 2000;25(10):509–515. DOI: 10.1016/s0968-0004(00)01667-4.
14. Binz H. K., Stumpp M. T., Forrer P., Amstutz P., Plückthun A. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *Journal of Molecular Biology*. 2003;332(2):489–503. DOI: 10.1016/s0022-2836(03)00896-9.
15. Goldstein R., Sosabowski J., Livanos M., Leyton J., Vigor K., Bhavsar G., Nagy-Davidescu G., Rashid M., Miranda E., Yeung J., Tolner B., Plückthun A., Mather S., Meyer T., Chester K. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015;42(2):288–301. DOI: 10.1007/s00259-014-2940-2.
16. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M., Garousi J., Chernov V., Bragina O., Orlova A. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of ^{99m}Tc-labeled DARPin G3. *Scientific Reports*. 2019;9(1):9405.
17. Bragina O., Chernov V., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A., Orlova A., Tashireva L., Sörensen J., Zelchan R., Medvedeva A., Deyev S., Tolmachev V. Phase I Trial of ^{99m}Tc-(HE)₃-G3, a DARPin-Based Probe

- for Imaging of HER2 Expression in Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2022;63(4):528–535. DOI: 10.2967/jnumed.121.262542.
18. Larkina M., Plotnikov E., Bezverkhniaia E., Shabanova Y., Tretyakova M., Yuldasheva F., Zelchan R., Schulga A., Konovalova E., Vorobyeva A. Comparative Preclinical Evaluation of Peptide-Based Chelators for the Labeling of DARPIn G3 with ^{99m}Tc for Radionuclide Imaging of HER2 Expression in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13443.
 19. Larkina M., Varvashenya R., Yuldasheva F., Plotnikov E., Bezverkhniaia E., Tretyakova M., Zelchan R., Schulga A., Konovalova E., Vorobyeva A., Belousov M., Orlova A., Tolmachev V., Deyev S. Comparative Preclinical Evaluation of HYNIC-Modified Designed Ankyrin Repeat Proteins G3 for the ^{99m}Tc-Based Imaging of HER2-Expressing Malignant Tumors. *Molecular Pharmaceutics*. 2024;21(4):1919–1932. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c01173.
 20. Варвашеня Р. Н., Прач А. А., Плотников Е. В., Деев С. М., Белоусов М. В., Ларькина М. С., Чернов В. И. Оценка функциональной пригодности лиофилизата таргетных каркасных белков с анкириновыми повторами для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2/neu в злокачественных опухолях. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(3):16–24. DOI: 10.20538/1682-0363-2024-3-16-24.
 21. Malakhov M. P., Mattern M. R., Malakhova O. A., Drinker M., Weeks S. D., Butt T. R. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics*. 2004;5(1–2):75–86.
 22. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Mitran B., Garousi J., Rinne S., Löfblom J., Orlova A., Deyev S. Comparison of tumor-targeting properties of directly and indirectly radiiodinated designed ankyrin repeat protein (DARPIn) G3 variants for molecular imaging of HER2. *International Journal of Oncology*. 2019;54(4):1209–1220.
 23. Киселева Д. Г., Зигагин Р. Х., Фотин Д. П., Маркин А. М., Проатерогенный протеомный профиль ЛПНП, полученных от пациентов с сахарным диабетом: иммунологические аспекты. *Российский иммунологический журнал*. 2024;27(2):253–258. DOI: 10.46235//1028-7221-16674-PPP.
 24. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003;17(20):2337–2342. DOI: 10.1002/rcm.1196.
 25. Gill S. C., von Hippel P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*. 1989;182(2):319–326. DOI: 10.1016/0003-2697(89)90602-7.
 - Oyen W. J. G., Vugts D. J., Hoekstra O. S., Schröder C. P., Menke-van der Houven van Oordt C. W., Guiot T., Brouwers A. H., Awada A., de Vries E. G. E., Flamen P. Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1): the ZEPHIR trial. *Annals of oncology*. 2016;27(4):619–624. DOI: 10.1093/annonc/mdv577.
 3. Tolmachev V. Imaging of HER-2 overexpression in tumors for guiding therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2008;14(28):2999–3019. DOI: 10.2174/138161208786404290.
 4. Wolff A. C., Somerfield M. R., Dowsett M., Hammond M. E. H., Hayes D. F., McShane L. M., Saphner T. J., Spears P. A., Allison K. H. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(22):3867–3872. DOI: 10.1200/jco.22.02864.
 5. Azhar A., Ahmad E., Zia Q., Rauf M. A., Owais M., Ashraf G. M. Recent advances in the development of novel protein scaffolds based therapeutics. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;102:630–641. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.045.
 6. Sörensen J., Velikyan I., Sandberg D., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V., Orlova A., Sandström M., Lubberink M., Olofsson H. Measuring HER2-receptor expression in metastatic breast cancer using [68Ga] ABY-025 Affibody PET/CT. *Theranostics*. 2016;6(2):262.
 7. Skuridin V. S., Stasyuk E. S., Bragina O. D., Yusubov M. S., Chernov V. I., Larkina M. S., Zelchan R. V., Rogov A., Sinilkin I., Larionova L. Development of radiopharmaceutical based on mini-antibody for early cancer detection. *Annual Congress of the European-Association-of-Nuclear-Medicine*. 2016;43:465–465.
 8. Bragina O. D., Larkina M. S., Stasyuk E. S., Chernov V. I., Yusubov M. S., Skuridin V. S., Deyev S. M., Zel'chan R. V., Buldakov M. A., Podrezova E. V., Belousov M. V. The development of a highly specific radiochemical compound based on labeled ^{99m}Tc recombinant molecules for targeted imaging of cells with the overexpression of Her-2/neu. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017;16(3):25–33. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-25-33.
 9. Bragina O. D., Chernov V. I., Zeltchan R. V., Sinilkin I. G., Medvedeva A. A., Larkina M. S. Alternative scaffolds in radionuclide diagnosis of malignancies. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(3):125–133. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2019-3-125-133
 10. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2015;55:489–511.
 11. Deyev S. M., Xu T., Liu Y., Schulga A., Konovalova E., Garousi J., Rinne S. S., Larkina M., Ding H., Gräslund T., Orlova A., Tolmachev V., Vorobyeva A. Influence of the Position and Composition of Radiometals and Radioiodine Labels on Imaging of Epcam Expression in Prostate Cancer Model Using the DARPIn Ec1. *Cancers*. 2021;13(14):3589. DOI: 10.3390/cancers13143589.
 12. Zelchan R., Chernov V., Medvedeva A., Rybina A., Bragina O., Mishina E., Larkina M., Varvashenya R., Fominykh A., Schulga A., Konovalova E., Vorobyeva A., Orlova A., Tashireva L., Deyev S. M., Tolmachev V. Phase I Clinical Evaluation of Designed Ankyrin Repeat Protein [^{99m}Tc]Tc(CO)₃-(HE)₃-Ec1 for Visualization of EpCAM-Expressing Lung Cancer. *Cancers*. 2024;16(16):2815. DOI: 10.3390/cancers16162815.

REFERENCES

1. Bartley A. N., Washington M. K., Ventura C. B., Ismaila N., Colasacco C., Benson A. B., Carrato A., Gulley M. L., Jain D., Kakar S., Mackay H. J., Streutker C., Tang L., Troxell M., Ajani J. A. HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2016;140(12):1345–1363. DOI: 10.5858/arpa.2016-0331-CP.
2. Gebhart G., Lamberts L. E., Wimana Z., Garcia C, Emonts P., Ameye L., Stroobants S., Huizing M., Aftimos P., Tol J,

13. Kobe B, Kajava A.V. When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends in Biochemical Sciences*. 2000;25(10):509–515. DOI: 10.1016/s0968-0004(00)01667-4.
14. Binz H. K., Stumpp M. T., Forrer P., Amstutz P., Plückthun A. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *Journal of Molecular Biology*. 2003;332(2):489–503. DOI: 10.1016/s0022-2836(03)00896-9.
15. Goldstein R., Sosabowski J., Livanos M., Leyton J., Vigor K., Bhavsar G., Nagy-Davidescu G., Rashid M., Miranda E., Yeung J., Tolner B., Plückthun A., Mather S., Meyer T., Chester K. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015;42(2):288–301. DOI: 10.1007/s00259-014-2940-2.
16. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M., Garousi J., Chernov V., Bragina O., Orlova A. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of ^{99m}Tc-labeled DARPin G3. *Scientific Reports*. 2019;9(1):9405.
17. Bragina O., Chernov V., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A., Orlova A., Tashireva L., Sörensen J., Zelchan R., Medvedeva A., Deyev S., Tolmachev V. Phase I Trial of ^{99m}Tc-(HE)₃-G3, a DARPin-Based Probe for Imaging of HER2 Expression in Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2022;63(4):528–535. DOI: 10.2967/jnumed.121.262542.
18. Larkina M., Plotnikov E., Bezverkhniaia E., Shabanova Y., Tretyakova M., Yuldasheva F., Zelchan R., Schulga A., Konovalova E., Vorobyeva A. Comparative Preclinical Evaluation of Peptide-Based Chelators for the Labeling of DARPin G3 with ^{99m}Tc for Radionuclide Imaging of HER2 Expression in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13443.
19. Larkina M., Varvashenya R., Yuldasheva F., Plotnikov E., Bezverkhniaia E., Tretyakova M., Zelchan R., Schulga A., Konovalova E., Vorobyeva A., Belousov M., Orlova A., Tolmachev V., Deyev S. Comparative Preclinical Evaluation of HYNIC-Modified Designed Ankyrin Repeat Proteins G3 for the ^{99m}Tc-Based Imaging of HER2-Expressing Malignant Tumors. *Molecular Pharmaceutics*. 2024;21(4):1919–1932. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c01173.
20. Varvashenya R. N. Prach A. A., Plotnikov E. B., Deev S. M., Belousov M. V., Larkina M. S., Chernov V. I. Assessing functional suitability of a lyophilized formulation containing designed ankyrin repeat proteins for radionuclide imaging of HER2/neu overexpression in malignant tumors. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(3):16–24. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2024-3-16-24.
21. Malakhov M. P., Mattern M. R., Malakhova O. A., Drinker M., Weeks S. D., Butt T. R. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics*. 2004;5(1–2):75–86.
22. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Mitran B., Garousi J., Rinne S., Löfblom J., Orlova A., Deyev S. Comparison of tumor-targeting properties of directly and indirectly radioiodinated designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 variants for molecular imaging of HER2. *International Journal of Oncology*. 2019;54(4):1209–1220.
23. Kiseleva D. G., Zigashin R. H., Fotin D. P., Markin A. M. Proatherogenic proteomic profile of LDL isolated from plasma of patients with diabetes mellitus: immunological aspects. *Russian Journal of Immunology*. 2024;27(2):253–258. (In Russ.) DOI: 10.46235//1028-7221-16674-PPP.
24. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003;17(20):2337–2342. DOI: 10.1002/rcm.1196.
25. Gill S. C., von Hippel P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*. 1989;182(2):319–326. DOI: 10.1016/0003-2697(89)90602-7.