



Разработка и изучение нового анти-HER2 терапевтического конъюгата на основе DARPin G3

А. А. Прач^{1,2} , М. С. Ларькина^{1,3} , С. В. Кривошеков³ , К. С. Бразовский¹ ,
М. В. Белоусов^{1,3} , Р. Х. Зиганшин⁴ , Е. В. Коновалова^{1,4} , А. А. Шульга^{1,4} ,
С. М. Деев^{1,4} , Е. В. Плотников¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (НИ ТПУ). 634050, Россия, г. Томск, проспект Ленина, д. 30

² 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, пер. Кооперативный, д. 5

³ 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

⁴ 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, вн. тер. г. муниципальный округ Коньково, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к. 1

✉ Контактное лицо: Прач Анастасия Александровна. E-mail: nastya.prach@mail.ru

Резюме

Введение. Сверхэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2) является значимым фактором агрессивного течения ряда злокачественных новообразований и определяет необходимость разработки новых эффективных подходов к проведению таргетной терапии. Одним из перспективных направлений являются конъюгаты «белок – лекарственное средство», обеспечивающие селективную доставку цитотоксических агентов в опухолевые клетки. В качестве альтернативы моноклональным антителам рассматриваются каркасные белки на основе анкириновых повторов (DARPin), отличающиеся высокой аффинностью, стабильностью и возможностью наработки в прокариотических системах. Однако стандартизация и аналитический контроль таких конъюгатов требуют разработки специализированных и валидированных методик.

Цель. Разработка терапевтического конъюгата на основе DARPin G3 и цитотоксического агента эмтанзина, а также создание адаптированных методик его стандартизации в форме активной фармацевтической субстанции.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся терапевтический конъюгат DARPin G3-ABD, специфичный к HER2, ковалентно связанный с эмтанзином через малеимидный линкер. Получение включало восстановление белка, конъюгацию и очистку методом эксклюзионной хроматографии. Для характеристики использовали методы УФ-спектрофотометрии, колориметрический анализ с бицинхониновой кислотой (BCA), нано-ВЭЖХ-МС/МС и электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Биологическую активность оценивали по выживаемости клеток аденокарциномы молочной железы линии SKBR3 с гиперэкспрессией HER2 в МТТ-тесте. Валидацию аналитической методики проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Результаты и обсуждение. Проведена комплексная характеристика белкового терапевтического конъюгата по показателям подлинности, содержания родственных примесей, количественного содержания и биологической активности. Подлинность конъюгата подтверждена методом ВЭЖХ-МС/МС, обеспечившим 100 % перекрытие аминокислотной последовательности. Электрофорез в ПААГ серий конъюгата продемонстрировал наличие одной основной полосы, подтверждая высокую чистоту и монодисперсность образцов при содержании димерной фракции менее 6 %. Количественное определение конъюгата G3-ABD-DM1 выполняли методами прямой УФ-спектрофотометрии при длине волны 252 нм и колориметрии с бицинхониновой кислотой. Валидация УФ-спектрофотометрической методики подтвердила ее специфичность, линейность ($R = 0,999$), отсутствие систематической погрешности и высокую прецизионность (RSD не более 2,06 %). Напротив, метод BCA характеризовался статистически значимой систематической погрешностью ($\delta = 2,76 \%$),

© Прач А. А., Ларькина М. С., Кривошеков С. В., Бразовский К. С., Белоусов М. В., Зиганшин Р. Х., Коновалова Е. В., Шульга А. А., Деев С. М., Плотников Е. В., 2026

© Издатель ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», 2026

© Prach A. A., Larkina M. S., Krivoshchekov S. V., Brazovskii K. S., Belousov M. V., Ziganshin R. Kh., Konovalova E. V., Shulga A. A., Deev S. M., Plotnikov E. V., 2026

© Publisher LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", 2026

что обосновывает преимущество УФ-спектрофотометрии для стандартизации субстанции. Конъюгат проявил выраженную дозозависимую цитотоксичность в отношении HER2-положительных клеток со значением $IC_{50} = 40 \pm 10$ нМ, тогда как отрицательный контроль без цитотоксического агента не влиял на жизнеспособность опухолевых клеток.

Заключение. Разработан и охарактеризован таргетный конъюгат на основе DARPin G3-ABD и эмтанзина, обладающий высокой чистотой, подтвержденной первичной структурой и специфической цитотоксической активностью в отношении HER2-экспрессирующих клеток. Предложен комплекс аналитических методик (УФ-спектрофотометрия, ВЭЖХ-МС/МС, SDS-PAGE), обеспечивающий надежный контроль качества конъюгата как активной фармацевтической субстанции для последующих доклинических исследований.

Ключевые слова: DARPin G3, эмтанзин, терапевтический конъюгат, УФ-спектрофотометрия, HER2, стандартизация качества

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

Вклад авторов. М. С. Ларькина, М. В. Белоусов, Е. В. Плотников – концептуализация исследования. М. С. Ларькина, К. С. Бразовский, М. В. Белоусов – разработка методологии. А. А. Прач, М. С. Ларькина, Р. Х. Зиганшин, Е. В. Коновалова, А. А. Шульга – проведение экспериментальных исследований. М. С. Ларькина, К. С. Бразовский, М. В. Белоусов, Е. В. Плотников – верификация и курация данных. А. А. Прач, М. С. Ларькина, С. В. Кривошеков, К. С. Бразовский, М. В. Белоусов, Р. Х. Зиганшин, Е. В. Коновалова, А. А. Шульга, С. М. Деев, Е. В. Плотников – написание текста рукописи. А. А. Прач, М. С. Ларькина, С. В. Кривошеков – редактирование текста статьи. М. С. Ларькина, М. В. Белоусов, С. М. Деев, Е. В. Плотников – общее научное руководство.

Для цитирования: Прач А. А., Ларькина М. С., Кривошеков С. В., Бразовский К. С., Белоусов М. В., Зиганшин Р. Х., Коновалова Е. В., Шульга А. А., Деев С. М., Плотников Е. В. Разработка и изучение нового анти-HER2 терапевтического конъюгата на основе DARPin G3. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(4). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-4-2345>

Поступила в редакцию: 19.04.2026

Поступила после рецензирования: 26.06.2026

Принята к публикации: 02.10.2026

Development and study of a novel anti-HER2 therapeutic conjugate based on DARPin G3

Anastasia A. Prach^{1,2} , Maria S. Larkina^{1,3} , Sergey V. Krivoshchekov³ ,
Konstantin S. Brazovskii¹ , Mikhail V. Belousov^{1,3} , Rustam Kh. Ziganshin⁴ ,
Elena V. Konovalova^{1,4} , Aleksey A. Shulga^{1,4} , Sergey M. Deev^{1,4} , Evgeny V. Plotnikov¹  

¹ National Research Tomsk Polytechnic University. 30, prospekt Lenina, Tomsk, 634050, Russia

² Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. 5, Kooperativny Lane, Tomsk, 634009, Russia

³ Siberian State Medical University. 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (IBCh RAS). Building 1, 16/10, Miklukho-Maklaya str., intra-city territory of a federal city Konkovo, Moscow, 117997, Russia

✉ **Corresponding author:** Anastasia A. Prach. **E-mail:** nastya.prach@mail.ru

Abstract

Introduction. Overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is a critical driver of malignancy in multiple solid tumors, underscoring the demand for innovative targeted therapeutics. Protein–drug conjugates offer selective delivery of highly potent cytotoxic payloads directly to tumor cells. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin)s represent a viable alternative to full-length monoclonal antibodies owing to their high binding affinity, thermal stability, and efficient production in prokaryotic expression systems. However, analytical characterization and standardization of DARPin-based conjugates necessitate dedicated, validated methodology.

Aim. To develop a targeted therapeutic conjugate comprising DARPin G3 and the cytotoxic agent emtansine, and to establish standardized analytical methods tailored for its quality control as an active pharmaceutical ingredient.

Materials and methods. The study evaluated the HER2-specific therapeutic conjugate DARPin G3-ABD covalently linked to emtansine (DM1) via a non-cleavable maleimide linker. Manufacturing involved site-specific protein reduction, chemical conjugation, and size-exclusion chromatographic purification. Physicochemical characterization was performed using UV spectrophotometry, the bicinchoninic acid (BCA) colorimetric assay, nano-HPLC-MS/MS, and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Biological activity was assessed in HER2-overexpressing human breast adenocarcinoma SKBR3 cells using the MTT cell viability assay. Method validation was conducted in accordance with pharmacopoeial guidelines.

Results and discussion. Comprehensive analytical profiling of the conjugate encompassed identity, related impurities, quantitative assay, and *in vitro* potency. Identity was verified by nano-HPLC-MS/MS, demonstrating 100 % amino acid sequence coverage. SDS-PAGE revealed a single major monomeric band with high electrophoretic purity and homodimeric impurities below 6 %. Quantitative determination was evaluated by direct UV spectrophotometry at 252 nm and the BCA assay. Validation demonstrated that the UV spectrophotometric assay is specific, linear ($R = 0.999$), free from systematic error, and highly precise ($RSD \leq 2.06$ %). Conversely, the BCA assay exhibited a statistically significant systematic bias ($\delta = 2.76$ %), confirming the superiority of direct UV spectrophotometry for active ingredient assay. The conjugate demonstrated dose-dependent cytotoxicity against HER2-positive cells with an $IC_{50} = 40 \pm 10$ nM, whereas the payload-free protein control showed no antiproliferative effect.

Conclusion. A targeted conjugate based on DARPIn G3-ABD and emtansine was successfully engineered and characterized, displaying high purity, confirmed primary sequence identity, and potent HER2-dependent cytotoxic activity. The established analytical panel provides a reliable basis for quality control of the conjugate as an active pharmaceutical ingredient in preclinical development.

Keywords: DARPIn G3, emtansine, therapeutic conjugate, UV spectrophotometry, HER2, quality standardization

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

Contribution of the authors. Maria S. Larkina, Mikhail V. Belousov, Evgeny V. Plotnikov — conceptualization. Maria S. Larkina, Konstantin S. Brazovskii, Mikhail V. Belousov — methodology. Anastasia A. Prach, Maria S. Larkina, Rustam Kh. Ziganshin, Elena V. Konovalova, Aleksey A. Shulga — investigation. Maria S. Larkina, Konstantin S. Brazovskii, Mikhail V. Belousov, Evgeny V. Plotnikov — data curation and validation. Anastasia A. Prach, Maria S. Larkina, Sergey V. Krivoshechekov, Konstantin S. Brazovskii, Mikhail V. Belousov, Rustam Kh. Ziganshin, Elena V. Konovalova, Aleksey A. Shulga, Sergey M. Deev, Evgeny V. Plotnikov — original draft preparation. Anastasia A. Prach, Maria S. Larkina, Sergey V. Krivoshechekov — review and editing. Maria S. Larkina, Mikhail V. Belousov, Sergey M. Deev, Evgeny V. Plotnikov — project supervision.

For citation: Prach A. A., Larkina M. S., Krivoshechekov S. V., Brazovskii K. S., Belousov M. V., Ziganshin R. Kh., Konovalova E. V., Shulga A. A., Deev S. M., Plotnikov E. V. Development and study of a novel anti-HER2 therapeutic conjugate based on DARPIn G3. *Drug development & registration*. 2026;15(4). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-4-2345>

Received: 19.04.2026

Revised: 26.06.2026

Accepted: 02.10.2026

ВВЕДЕНИЕ

Сверхэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2) является одним из ключевых молекулярных факторов агрессивного течения ряда злокачественных новообразований, включая рак молочной железы, яичников и желудка. HER2-положительный фенотип выявляется примерно у 15 % пациентов и при отсутствии таргетной терапии ассоциирован с неблагоприятным клиническим прогнозом [1, 2]. В связи с этим разработка эффективных и селективных лекарственных средств, обеспечивающих направленное воздействие на HER2-положительные опухоли, относится к приоритетным направлениям современной онкофармакологии и биофармацевтической технологии.

Одним из наиболее перспективных подходов к терапии HER2-положительных опухолей являются конъюгаты антител с цитотоксическими агентами (antibody-drug conjugates, ADC), сочетающие высокую специфичность распознавания опухолевой мишени и выраженную противоопухолевую активность. Примером клинически успешной реализации данной концепции служит трастузумаб-энтанзин, одобренный

для лечения HER2-положительного рака молочной железы [3]. Вместе с тем классические ADC на основе полноразмерных моноклональных антител характеризуются значительной молекулярной массой (≈ 150 кДа) и ограниченной способностью к равномерной пенетрации в опухолевую ткань, особенно в условиях недостаточной васкуляризации плотных опухолей [4]. Это обуславливает необходимость поиска альтернативных таргетных платформ, способных обеспечить более эффективную доставку цитотоксического агента в опухолевый очаг.

В последние годы особое внимание уделяется молекулам DARPIn (Designed Ankyrin Repeat Proteins), представляющим собой компактные, высокостабильные белковые каркасы с высокой аффинностью и специфичностью к выбранной молекулярной мишени [5–7]. Использование анти-HER2 DARPIn G3 в качестве таргетного молекулы открывает возможности для создания терапевтических конъюгатов существенно меньшего размера по сравнению с традиционными иммуноглобулинами, что потенциально улучшает их тканевое распределение в солидной опухоли и повышает терапевтический индекс.

Дополнительное включение в структуру белка альбуминсвязывающего домена (ABD) позволяет увеличить время циркуляции конъюгата в кровеносном русле за счет обратимого связывания с эндогенным сывороточным альбумином [8], оптимизируя фармакокинетический профиль и усиливая противоопухолевый эффект *in vivo*.

Несмотря на активное развитие платформы ADC, вопросы стандартизации и аналитического контроля качества конъюгатов на основе альтернативных белковых каркасов, в том числе DARPin, остаются недостаточно проработанными. Сложная молекулярная организация таких биоконъюгатов, включающая полипептидную цепь, химический линкер, низкомолекулярный цитотоксический агент и потенциальные примеси деградации, формирует совокупность критических показателей качества, требующих комплексной стандартизации. Стандартные аналитические методики, применяемые для характеристики интактных белков или нативных моноклональных антител, часто не позволяют адекватно описать гетерогенность и специфические свойства DARPin-конъюгатов. Информативность аналитических методов существенно варьирует в зависимости от архитектуры конъюгата и условий анализа, что определяет необходимость разработки комплекса валидированных методик контроля качества, адаптированных к конкретной конструкции DARPin [9].

В соответствии с современными регуляторными требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) контроль качества лекарственных средств белковой природы, получаемых с применением технологий рекомбинантной ДНК, включает подтверждение подлинности действующего вещества, определение родственных и производственных примесей, верификацию первичной структуры, количественное определение активного компонента и подтверждение стабильности технологического процесса¹. Для белковых терапевтических конъюгатов аналитический регламент существенно расширяется по сравнению с неконъюгированными макромолекулами вследствие наличия цитотоксической нагрузки и гетерогенности линкера. Обязательному контролю подлежат структурная целостность белкового скэффолда, молярное соотношение лекарственного средства и белка (drug-to-antibody ratio, DAR, или drug-to-protein ratio, DPR), гомогенность, содержание свободного цитотоксина и стабильность линкерного фрагмента [10].

Цель настоящего исследования – разработка терапевтического конъюгата на основе DARPin G3 и цитотоксического агента эмтанзина, а также создание и валидация адаптированных аналитических методик его стандартизации в форме активной фармацевтической субстанции.

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> Ссылка активна на 05.01.2026.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и очистка целевого конъюгата

Объектом исследования являлся терапевтический биоконъюгат, представляющий собой слитый рекомбинантный белок DARPin G3, специфичный к рецептору HER2, модифицированный альбуминсвязывающим доменом (ABD) для пролонгации системной циркуляции (рисунок 1, А). Белок был ковалентно соединен с цитотоксическим агентом эмтанзином (DM1) через нерасщепляемый малеимидакапроильный линкер. Биосинтез, выделение и металлохелатную очистку белка DARPin G3-ABD осуществляли по ранее оптимизированному протоколу [8]. Возможность использования УФ-спектрофотометрии для стандартизации конъюгата была предварительно исследована авторами [11].

Синтез целевого конъюгата осуществляли в два последовательных этапа. На первой стадии проводили селективное восстановление единственного С-концевого остатка цистеина белковой молекулы 150-кратным молярным избытком дитиотреитола (DTT; ООО «Диаэм», Россия) в дегазированном 0,01 М фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, pH 7,4) при температуре 40 °С в течение 1 ч. Избыток восстановителя и низкомолекулярные компоненты удаляли гель-фильтрацией на колонках NAP-5 (GE HealthCare, Великобритания), уравновешенных дегазированным буфером PBS.

К элюированному мономерному белку немедленно добавляли 5-кратный молярный избыток малеимидакапроил-эмтанзина (mcDM1, MedChemExpress, США) с последующей инкубацией смеси при 40 °С в течение 1 ч и затем при 4 °С в течение ночи (рисунок 1, Б). Очистку конъюгата DARPin G3-ABD-DM1 от не вступившего в реакцию низкомолекулярного цитотоксина проводили методом гель-фильтрации на колонках NAP-5, элюируя целевую фракцию 0,01 М PBS (pH 7,4).

В качестве отрицательного контроля восстановленный белок алкилировали 2-хлорацетамидом (CAA; CDH Fine Chemicals, Индия) в аналогичных условиях реакции, блокируя свободную тиольную группу без присоединения цитотоксического агента.

УФ-спектрофотометрия и колориметрический анализ (BCA)

Количественное определение конъюгата проводили методом прямой УФ-спектрофотометрии при длине волны 252 нм и колориметрическим методом с использованием бицинхониновой кислоты (BCA).

Для спектрофотометрических измерений навеску стандартного образца конъюгата DARPin G3-ABD-DM1 с концентрацией 0,60 мг/мл растворяли в 0,01 М PBS (pH 7,4). Электронные спектры поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США) в кварце-

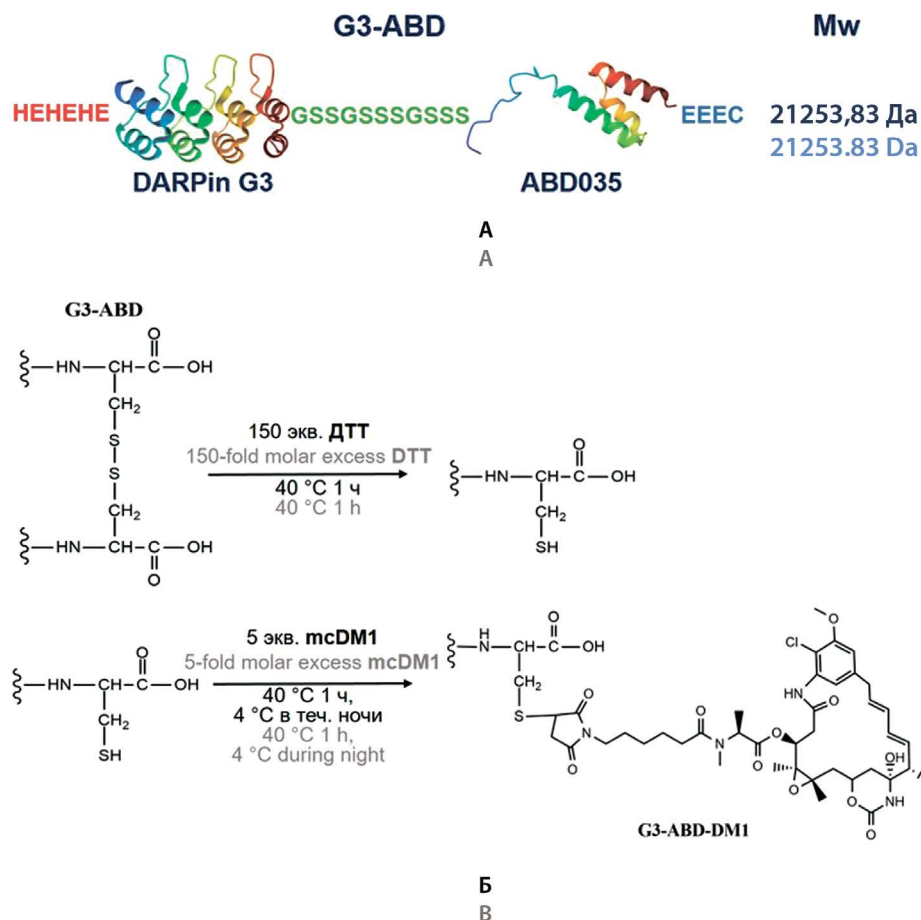


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 1. Структура и получение G3-ABD-DM1:

A – схематическое изображение белка G3-ABD; **Б** – схема ковалентной конъюгации белка G3-ABD с эмтанзином

Figure 1. Structure and preparaion of the G3-ABD-DM1:

A – schematic representation of the G3-ABD protein; **B** – conjugation scheme of the G3-ABD protein with emtansine

вой кювете с длиной оптического пути 10 мм относительно воды очищенной.

Для построения градуировочного графика по методу BCA готовили серию стандартных разведений неконъюгированного белка DARPin G3-ABD в 0,01 M PBS (pH 7,4) с концентрациями 4,00; 2,00; 1,00; 0,50; 0,25 и 0,125 мг/мл. Раствором сравнения служил 0,01 M PBS. В соответствии с регламентом аналитического набора BCA Protein Assay Kit (FineTest, Китай) рабочий реагент готовили смешиванием 50 частей реагента А и 1 части реагента Б. В лунки 96-луночного микропланшета вносили 100 мкл рабочего раствора и 20 мкл исследуемого образца. Планшет инкубировали при 37 °C в течение 30 мин на термостатируемом шейкере, охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм на микропланшетном спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США).

Идентификация первичной структуры методом нано-ВЭЖХ-МС/МС

Образцы конъюгата концентрировали на вакуумном концентраторе SpeedVac (Savant, Франция) и растворяли в лизирующем буфере (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1 % дезоксихолат натрия; 10 mM TCEP; 20 mM 2-хлорацетамид). Смесь прогревали при 85 °C в течение 10 мин и подвергали исчерпывающему трипсинолизу модифицированным трипсином (соотношение белок : фермент 50:1 по массе) в 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) при 37 °C в течение 16 ч. Ферментативную реакцию останавливали добавлением трифторуксусной кислоты (ТФУ) до конечной концентрации 2 %.

Образовавшиеся пептиды обессоливали на микролонках StageTip (сорбент SDB-RPS), элюировали раствором 5%-м NH₄OH в 60%-м ацетонитриле, высушивали и восстанавливали в смеси 0,1%-й ТФУ / 2%-м ацетонитрил.

Хромато-масс-спектрометрический анализ выполняли на нанопоточном хроматографе UltiMate 3000 RSLCnano, соединенном с масс-спектрометром высокого разрешения Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Fisher Scientific, США). Разделение пептидов проводили на аналитической колонке C18 (длина 50 см, внутренний диаметр 75 мкм) в градиенте подвижной фазы ацетонитрила, содержащей 0,1%-й муравьиной кислоты, при скорости потока 300 нл/мин. Идентификацию пептидов и картирование последовательности осуществляли в программной среде PEAKS Studio 11 по объединенной базе данных *Escherichia coli* с добавлением аминокислотной последовательности целевой конструкции G3-ABD-DM1; в качестве переменных модификаций учитывали карбамидометилирование цистеина (+57,02 Да), деамидирование аспарагина/глутамина (+0,98 Да) и окисление метионина (+15,99 Да).

Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE)

Электрофоретическую чистоту, гомогенность и молекулярную массу белкового конъюгата анализировали методом вертикального гель-электрофореза в 15%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в невосстанавливающих условиях по методике Лэммли [12]. На дорожки геля наносили по 2,0 мкг анализируемых серий конъюгата. В качестве стандартов молекулярной массы использовали референсный набор маркерных белков широкого диапазона (10–250 кДа, Bio-Rad, США). Детекцию белковых зон выполняли окрашиванием коллоидным раствором кумасси ярко-синего G-250. Денситометрическую обработку электрофореграмм проводили с использованием программного пакета GelAnalyzer (версия 23.1.1).

Оценка специфической цитотоксической активности in vitro

Биологическую активность конъюгата оценивали колориметрическим МТТ-тестом по ингибированию пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы человека линии SKBR3, характеризующейся амплификацией гена *ERBB2* и гиперэкспрессией онкопротеина HER2. Клетки культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (ООО «Пан-Эко», Россия), содержащей 10%-й фетальной бычьей сыворотки (FBS; HyClone, США) и 1%-го раствора антибиотиков пенициллина-стрептомицина при 37 °C в атмосфере 5%-го CO₂.

Клетки рассевали в 96-луночные планшеты с плотностью 3 × 10³ клеток на лунку и инкубировали 24 ч для адгезии. Затем в лунки вносили серийные разведения конъюгата DARPin G3-ABD-DM1 либо отрицательного контроля (G3-ABD-CAA) в диапазоне концентраций от 0,1 до 1000 нМ. Спустя 72 ч инкубации культуральную среду аспирировали и вносили по

100 мкл раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ, 0,5 мг/мл в PBS). После 4 ч инкубации кристаллы формазана солибилизировали добавлением 100 мкл диметилсульфоксида. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 570 нм (опорная длина волны – 650 нм). Расчет концентрации полумаксимального ингибирования пролиферации (IC₅₀) выполняли методом нелинейной четырехпараметрической логистической регрессии в программе GraphPad Prism 9.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Терапевтический конъюгат на основе DARPin G3-ABD по совокупности физико-химических и биологических характеристик относится к биофармацевтическим препаратам, получаемым с применением рекомбинантных технологий. Согласно требованиям ОФС.1.7.1.0007 «Лекарственные средства, получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК»¹, контроль качества подобных макромолекулярных систем предусматривает комплексный аналитический контроль, включающий подтверждение подлинности, оценку чистоты и содержания примесей, количественное определение и подтверждение биологической активности. Валидацию аналитических процедур выполняли в соответствии с положениями фармакопейных статей ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик»² и ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний»³.

Спектрофотометрический и колориметрический анализ

Для количественной оценки субстанции G3-ABD-DM1 сопоставлены два аналитических подхода: прямая УФ-спектрофотометрия и колориметрический ВСА-метод. Выбор аналитической длины волны 252 нм обусловлен присутствием сопряженных хромофорных систем в молекуле майтанзиноидного токсина DM1, дающих интенсивное поглощение в ближней УФ-области, где белковая матрица DARPin демонстрирует сравнительно низкую удельную экстинкцию.

¹ ОФС.1.7.1.0007 «Лекарственные средства, получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-9/lekarstvennye-sredstva-poluchaemye-s-ispolzovaniem-tekhnologii-rekombinantnoy-dnk/> Ссылка активна на 05.01.2026.

² ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/> Ссылка активна на 05.01.2026.

³ ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-fizicheskikh-fiziko-khimicheskikh-i-khimicheskikh-ispytaniy/> Ссылка активна на 05.01.2026.

Оценка линейности показала, что оптическая плотность стандартных растворов конъюгата в интервале концентраций от 0,10 до 0,80 мг/мл подчиняется линейной зависимости:

$$y = 1,6376x - 0,0697 \quad r = 0,999,$$

что подтверждает соблюдение закона Бугера – Ламберта – Бера во всем рабочем аналитическом диапазоне.

Результаты валидационной оценки правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики прямого УФ-спектрофотометрического определения приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты определения правильности, сходимости и внутрилабораторной прецизионности методики прямого УФ-спектрофотометрического анализа

Table 1. Evaluation of accuracy, repeatability, and intermediate precision of the direct UV spectrophotometric method

Аналитик Analyst	μ , мг/мл μ , mg/ml	$\bar{x}$, мг/мл $\bar{x}$, mg/ml	S	Δx	RSD, %	$t_{\text{расч.}}$ $t_{\text{табл.}}$	δ
№ 1	0,580	0,579	0,007	0,006	1,268	0,152	0,064
№ 1	0,390	0,388	0,007	0,005	1,736	0,930	0,541
№ 1	0,290	0,288	0,006	0,005	2,059	0,655	0,448
№ 2	0,390	0,388	0,007	0,006	1,906	0,847	0,541

Примечание. μ – истинное содержание; $\bar{x}$ – среднее значение ($n=9$); S – выборочное стандартное отклонение; Δx – доверительный интервал ($P=95\%$); RSD – относительное стандартное отклонение; $t_{\text{расч.}}$ – расчетное значение критерия Стьюдента ($t_{\text{табл.}} = 2,31$); δ – относительная систематическая ошибка.

Note. μ – true content; $\bar{x}$ – mean value ($n=9$); S – sample standard deviation; Δx – confidence interval ($P=95\%$); RSD – relative standard deviation; $t_{\text{расч.}}$ – calculated Student's t-value ($t_{\text{табл.}} = 2,31$); δ – relative systematic error.

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Величины RSD во всех сериях измерений не превышали 2,06 %, удовлетворяя критерию приемлемости ($RSD \leq 5\%$). Все расчетные значения критерия Стьюдента ($t_{\text{расч.}} \leq 0,930$) оказались существенно ниже критического ($t_{\text{табл.}} = 2,31$ ($P=95\%$, $f=8$)), что свидетельствует об отсутствии статистически значимой систематической погрешности прямого УФ-спектрофотометрического определения.

Колориметрический анализ на основе бицинхоиновой кислоты основан на восстановлении ионов Cu^{2+} до Cu^+ пептидными связями и остатками цистеина, цистина, триптофана и тирозина с последующим образованием пурпурного хелата Cu^+ с бицинхони-

новой кислотой. Поскольку аминокислотный состав бычьего сывороточного альбумина (стандартный калибратор) существенно отличается от каркасного белка G3-ABD, градуировку проводили по рекомбинантному неконъюгированному белку G3-ABD в диапазоне концентраций 0,125–4,00 мг/мл (рисунок 2). Калибровочная зависимость удовлетворительно описывалась линейным уравнением:

$$y = 0,2125x + 0,1330 \quad r = 0,996,$$

что согласуется с фармакопейными рекомендациями по определению общего белка¹.

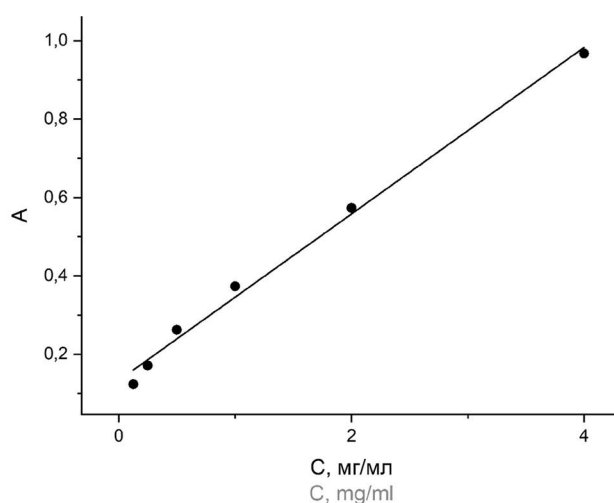


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 2. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации G3-ABD при использовании BCA-реагента

Figure 2. Linear calibration plot of absorbance versus G3-ABD concentration using the BCA reagent

Сравнительная метрологическая оценка УФ-спектрофотометрии и метода BCA приведена в таблице 2.

Сравнение выборочных дисперсий с помощью критерия Фишера ($F_{\text{расч.}} = 1,461 < F_{\text{табл.}} = 4,155$) показало отсутствие статистически значимых различий между прецизионностью двух методик. Однако для метода BCA расчетный критерий Стьюдента ($t_{\text{расч.}} = 6,983$) многократно превышает критическое значение ($t_{\text{табл.}} = 2,18$), подтверждая наличие выраженной систематической погрешности определения ($\delta = 2,76\%$).

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. ОФС.1.2.3.0012 «Определение белка». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/1/1-2/1-2-3/opredelenie-belka/> Ссылка активна на 05.01.2026.

Таблица 2. Сравнительная статистическая оценка прецизионности и правильности спектрофотометрической методики и колориметрического метода ВСА

Table 2. Comparative statistical evaluation of precision and accuracy for UV spectrophotometric and BCA methods

	μ	f	$\bar{x}$	S	$\epsilon, \%$	$t_{\text{расч.}} / t_{\text{табл.}}$	$F_{\text{расч.}} / F_{\text{табл.}}$	$\delta, \%$
УФ-спектрометрия UV spectrometry	0,580	12	0,58	0,011	0,027	0,665	1,461	–
Методика с ВСА Technique with BCA	1,380	12	1,42	0,016	0,024	6,983		2,756

Примечание. f – число степеней свободы; ϵ – относительная погрешность отдельного определения; $F_{\text{расч.}}$ – расчетное значение критерия Фишера ($F_{\text{табл.}} = 4,16$ при $P = 0,99$); критерий Стьюдента $t_{\text{табл.}} = 2,18 (P = 95 \%)$.

Note. f – number of degrees of freedom; ϵ – relative error of an individual determination; $F_{\text{calc.}}$ – calculated F-value ($F_{\text{tab.}} = 4.16$ at $P = 0.99$); critical value of Student’s t-test $t_{\text{tab.}} = 2.18 (P = 95 \%)$.

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Выявленная систематическая погрешность может быть обусловлена особенностями формирования хромогенного комплекса в ВСА-анализе и отклонением градуировочной зависимости от строгой линейности, что способно приводить к систематическому смещению результатов при использовании линейной аппроксимации [13]. Таким образом, прямая УФ-спектрофотометрия при 252 нм превосходит колориметрический метод ВСА по точности, экспрессности и воспроизводимости, что позволяет рекомендовать ее для рутинной стандартизации субстанции G3-ABD-DM1.

Подтверждение первичной структуры методом tandemной масс-спектрометрии

Для структурной идентификации конъюгата оптимизированы параметры денатурации и трипсинолиза. Проведение трипсинолиза при 37 °C в течение 16 ч после термической денатурации обеспечило исчерпывающее ферментативное расщепление.

По данным tandemной масс-спектрометрии нано-ВЭЖХ-МС/МС, совокупность идентифицированных пептидных фрагментов обеспечила 100 % перекрытие теоретической аминокислотной последовательности слитого белка DARPIn G3-ABD (рисунок 3). Спектральный анализ подтвердил ковалентное присоединение малеимидапроил-эмтанзина строго по С-концевому остатку цистеина, а также позволил идентифицировать фоновые модификации аминокислот, возникающие в процессе пробоподготовки (частичное окисление метионина и деамидирование аспарагина).

Оценка электрофоретической чистоты и молекулярной массы (SDS-PAGE)

Анализ пяти независимых серий субстанции конъюгата DARPIn G3-ABD-DM1 методом вертикального SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях

выявил наличие четкой дискретной полосы, соответствующей мономерной форме целевого биоконъюгата (рисунок 4, А).

Калибровочная зависимость десятичного логарифма молекулярной массы белков-маркеров от их относительной подвижности (R_f) характеризовалась высокой линейностью:

$$y = -1,2797x + 2,0951 \quad r = 0,989.$$

Экспериментально определенная молекулярная масса мономерного конъюгата составила $22,17 \pm 0,43$ кДа, что согласуется с расчетным теоретическим значением (22,09 кДа). Денситометрический анализ показал, что содержание родственной технологической примеси – невосстановленного димера белка – не превышало 6 %, подтверждая высокую монодисперсность и чистоту полученной субстанции.

Специфическая противоопухолевая активность in vitro

Цитотоксическую активность конъюгата исследовали на клетках аденокарциномы молочной железы линии SKBR3, гиперэкспрессирующих HER2 (рисунок 5). Конъюгат DARPIn G3-ABD-DM1 индуцировал выраженную дозозависимую гибель опухолевых клеток в наномолярном диапазоне концентраций со значением полумаксимального ингибирования $IC_{50} = (40 \pm 10)$ нМ.

Контрольный препарат DARPIn G3-ABD-CAA, лишенный цитотоксической молекулы майтанзиноида, не оказывал существенного влияния на пролиферативную активность клеток SKBR3 даже при максимальных испытанных концентрациях (жизнеспособность более 90 %). Это доказывает, что цитотоксический эффект обусловлен рецептор-опосредованной интернализацией конъюгата и внутриклеточным высвобождением майтанзиноида DM1, а не неспецифической токсичностью белкового носителя.



Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 3. Карта перекрытия аминокислотной последовательности конъюгата G3-ABD-DM1 идентифицированными пептидными фрагментами по данным тандемной масс-спектрометрии. Модификации аминокислотных остатков: D – деамидирование; O – окисление; A – ацетилирование

Figure 3. Sequence coverage map of the G3-ABD-DM1 conjugate by identified peptide fragments using nano-HPLC-MS/MS. Modifications: D – deamidation; O – oxidation; A – acetylation

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан технологический способ получения целевого терапевтического конъюгата G3-ABD-DM1 на основе анти-HER2 каркасного белка DARPIn G3-ABD и майтанзиноида эмтанзина, обеспечивающий получение субстанции высокой степени чистоты с содержанием димерных примесей менее 6 %.
2. Методом нано-ВЭЖХ-МС/МС подтверждена первичная структура конъюгата со 100 % перекры-
- тием аминокислотной последовательности и установлена сайт-специфическая локализация линкера по С-концевому остатку цистеина.
3. Разработана и валидирована методика количественного определения конъюгата методом прямой УФ-спектрофотометрии при длине волны 252 нм. Показано, что в отличие от колориметрического метода BCA, УФ-спектрофотометрия не отягощена систематической ошибкой и обладает высокой воспроизводимостью ($RSD \leq 2,06\%$).

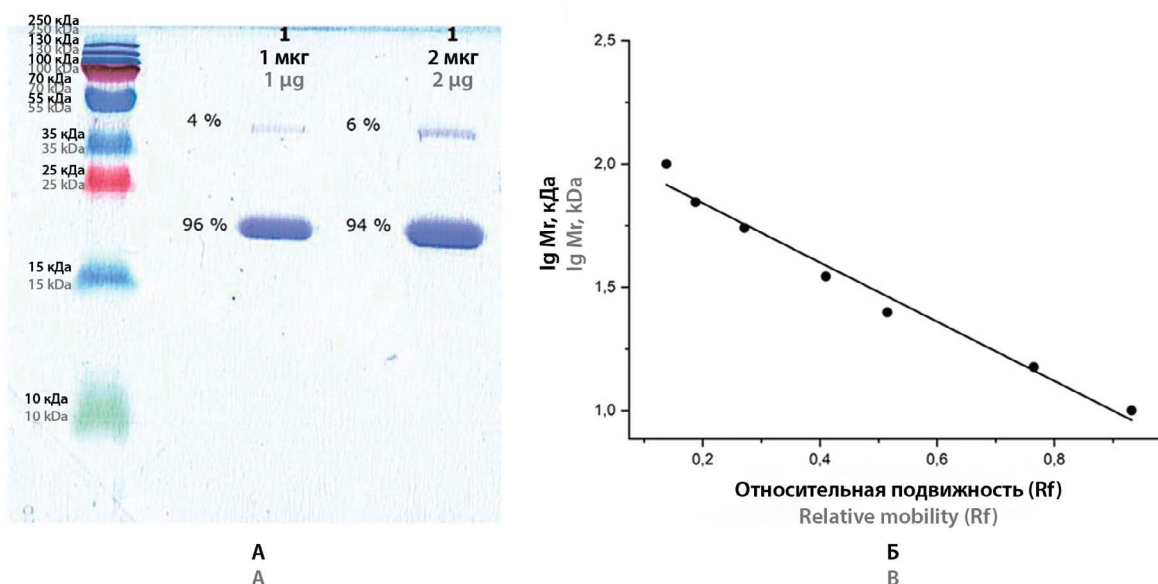


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 4. Результаты электрофореза в ПААГ конъюгата G3-ABD-DM1 в невосстанавливающих условиях:

А – электрофореграмма серий конъюгата после очистки (крайняя левая дорожка – маркеры молекулярной массы, 10–250 кДа); **Б** – график линейной регрессии зависимости логарифма молекулярной массы белков-маркеров от относительной подвижности (R_f)

Figure 4. Non-reducing SDS-PAGE analysis of the G3-ABD-DM1 conjugate:

A – electrophoregram of purified conjugate batches (leftmost lane: molecular weight standards, 10–250 kDa); **B** – linear calibration curve of log molecular weight versus relative mobility (R_f)

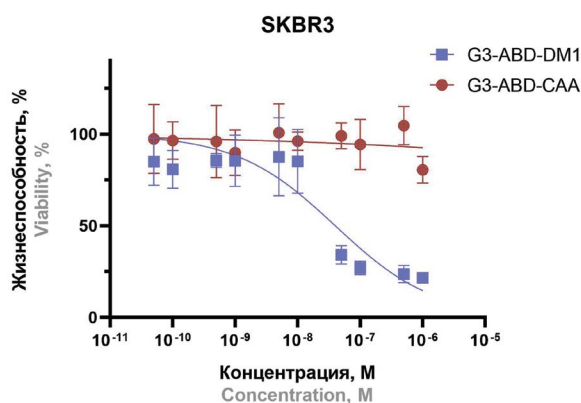


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 5. Жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы линии SKBR3 (гиперэкспрессия HER2) после 72 ч инкубации с конъюгатом G3-ABD-DM1 и отрицательным контролем G3-ABD-CAA. Оптическая плотность интактных клеток принята за 100 %. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (Mean $\pm$ SD, $n = 4$)

Figure 5. Viability of HER2-overexpressing SKBR3 cells after 72 h incubation with G3-ABD-DM1 conjugate and negative control G3-ABD-CAA. Viability of untreated control was set to 100 %. Data are expressed as Mean $\pm$ SD ($n = 4$)

- Подтверждена высокая специфическая цитотоксичность конъюгата в отношении HER2-экспрессирующих опухолевых клеток SKBR3 ($IC_{50} = 40 \pm \pm 10$ нМ). Предложенный аналитический комплекс рекомендуется для контроля качества субстанции конъюгата на этапах доклинической разработки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Tuefferd M., Couturier J., Penault-Llorca F., Vincent-Salomon A., Broet P., Guastalla J.-P., Allouache D., Combe M., Weber B., Pujade-Lauraine E. HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients. *PLoS ONE*. 2007;2(11):e1138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001138>
- Høgdall E.V.S., Christensen L., Kjaer S. K., Blaakaer J., Bock J.E., Glud E., Nørgaard-Pedersen B., Høgdall C. K. Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish "MALOVA" ovarian cancer study. *Cancer*. 2003;98(1):66–73. <https://doi.org/10.1002/cncr.11476>
- Ballantyne A., Dhillon S. Trastuzumab emtansine: first global approval. *Drugs*. 2013;73(7):755–765. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0050-2>
- Gauzy-Lazo L., Sassoon I., Brun M.-P. Advances in antibody–drug conjugate design: current clinical landscape and future innovations. *SLAS Discovery*. 2020;25(8):843–868. <https://doi.org/10.1177/2472555220912955>

5. Larkina M., Varvashenya R., Prach A., Plotnikov E., Tretyakova M., Eskova D., Bodenko V., Yanovich G., Schulga A., Konovalova E., Ziganshin R., Belousov M., Chernov V., Tolmachev V., Deyev S. The position of ^{99m}Tc -HYNIC and the molecular design of the DARPIn G3 constructs influence the selection of an imaging tracer to detect expression in HER2-expressing tumors. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2026;335:1945–1959. <https://doi.org/10.1007/s10967-026-10739-w>
6. 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. <https://doi.org/10.3390/cancers16162815>
7. 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. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-3-16-24> [Varvashenya R.N., Prach A.A., Plotnikov E.V., 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. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-3-16-24>]
8. Deyev S.M., Oroujeni M., Garousi J., Gräslund T., Li R., Rosly A.H.B., Orlova A., Konovalova E., Schulga A., Vorobyeva A., Tolmachev V. Preclinical evaluation of HER2-targeting DARPIn G3: impact of albumin-binding domain (ABD) fusion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(8):4246. <https://doi.org/10.3390/ijms25084246>
9. Wakankar A., Chen Y., Gokarn Y., Jacobson F.S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *mAbs*. 2011;3(2):161–172. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.2.14960>
10. Li M., Zhao X., Yu C., Wang L. Antibody-drug conjugate overview: a state-of-the-art manufacturing process and control strategy. *Pharmaceutical Research*. 2024;41(3):419–440. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03649-z>
11. Прач А.А., Ларькина М.С., Кривошеков С.В., Белоусов М.В., Плотников Е.В. Оценка возможности использования метода УФ-спектрофотометрии для стандартизации нового таргетного конъюгата на основе рекомбинантного слитого белка и эмтанзина. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2026;(1):97–104. [Prach A.A., Larkina M.S., Krivoshchekov S.V., Belousov M.V., Plotnikov E.V. Evaluation of the feasibility of using UV spectrophotometry for standardizing a new targeted conjugate based on a recombinant fusion protein and emtansine. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2026;(1):97–104. (In Russ.)]
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
13. Rogatsky E. Pandora box of BCA assay. Investigation of the accuracy and linearity of the microplate bicinchoninic protein assay: Analytical challenges and method modifications to minimize systematic errors. *Analytical Biochemistry*. 2021;631:114321. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114321>