

Разработка и валидация методик определения качества химического предшественника – рекомбинантного белка на основе анкириновых повторов для EGFR-направленной радионуклидной визуализации опухолей

Янович Г. Е. ^{1,2}

*аспирант кафедры фармацевтического анализа, инженер;
ORCID: 0009-0006-0383-3296; SPIN: 8612-7876*

Прач А. А. ²

*инженер;
ORCID: 0000-0002-6975-2361; SPIN: 3122-5450*

Кадырова Т. В. ¹

*к. фарм. н., доцент кафедры фармацевтического анализа;
ORCID: 0000-0002-2119-0259; SPIN: 3201-7263*

Кривошеков С. В. ¹

*к. х. н., доцент кафедры фармацевтического анализа;
ORCID: 0000-0001-5505-7141; SPIN: 1064-5950*

Шульга А. А. ^{2,3}

*к. б. н, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник;
ORCID: 0000-0003-3425-0828; SPIN: 2627-9638*

Коновалова Е. В. ^{2,3}

*инженер, младший научный сотрудник;
ORCID: 0000-0002-4187-376X*

Зиганшин Р. Х. ³

*старший научный сотрудник;
ORCID: 0000-0002-7931-519X; SPIN: 5850-6920*

Деев С. М. ^{2,3}

*д. б. н., ведущий научный сотрудник;
ORCID: 0000-0002-3952-0631; SPIN: 2562-1845*

Белоусов М. В. ^{1,2}

*д. фарм. н., профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, профессор ИШХБМТ;
ORCID: 0000-0002-2153-7945; SPIN: 8185-8117*

Ларькина М. С. ^{1,2}

*д. фарм. н., профессор кафедры фармацевтического анализа, старший научный сотрудник;
ORCID: 0000-0003-1176-2441; SPIN: 2812-7907*

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ) Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт,

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ) Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина,

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Россия

Автор для корреспонденции: Янович Глеб Евгеньевич, e-mail: sonne_gleb@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 09.05.2026

Принята к печати: 10.06.2026

Аннотация

Введение. Сверхэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) характерна для ряда злокачественных новообразований, что делает его важной молекулярной мишенью для таргетной радионуклидной визуализации. Сконструированный анкириновый белок DARPIn (HE)₃-E01 с субнаномолярным сродством к EGFR рассматривается как перспективный химический предшественник для приготовления радиофармпрепаратов с технецием-99m или йодом-123. Для внедрения в фармацевтическую практику необходим комплекс валидированных методик контроля качества данного белка. **Цель.** Разработка и валидация методик идентификации, оценки чистоты и количественного определения белка DARPIn (HE)₃-E01. **Материалы и методы.** Подлинность подтверждали хромато-масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (LC-ESI/MS) и электрофорезом в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Количественное определение осуществляли методами прямой УФ-спектрофотометрии при 280 нм и колориметрии с бицинхониновой кислотой (BCA). Валидацию проводили по критериям специфичности, линейности, правильности (метод добавок) и прецизионности (сходимость, внутрилабораторная прецизионность). Сравнение двух количественных методик выполняли с помощью F- и t-критериев. **Результаты.** Масс-спектрометрический анализ показал полное совпадение экспериментальной молекулярной массы белка (18 260,29 Да) с теоретически ожидаемой (18 260,25 Да). Электрофоретическое определение молекулярной массы дало значение 18,1 кДа, а чистота белка составила не менее 99 %, при этом содержание примесей не превышало 1 %. Обе количественные методики продемонстрировали линейность в исследованном диапазоне концентраций (коэффициенты корреляции 0,9979 и 0,9997), высокую правильность (CV не более 2 % для обеих методик) и прецизионность (RSD <2%). Статистически значимых различий между результатами двух методик не выявлено ($p > 0,05$). **Заключение.** Разработанные методики идентификации и количественного определения DARPIn (HE)₃-E01 успешно валидированы и могут быть включены в проект нормативной документации для контроля качества химического предшественника, предназначенного для создания EGFR-направленных радиофармпрепаратов.

Ключевые слова: Дарпин, EGFR, химический предшественник, контроль качества, валидация методик

doi: 10.29234/2308-9113-2026-14-3-72-87

Для цитирования: Янович Г. Е., Прач А. А., Кадырова Т. В., Кривошеков С. В., Шульга А. А., Коновалова Е. В., Зиганшин Р. Х., Деев С. М., Белоусов М. В., Ларькина М. С. Разработка и валидация методик определения качества химического предшественника – рекомбинантного белка на основе анкириновых повторов для EGFR-направленной радионуклидной визуализации опухолей. *Медицина* 2026; 14(3): 72-87. doi: 10.29234/2308-9113-2026-14-3-72-87

Введение

Семейство рецепторов эпидермального фактора роста человека, именуемое также рецепторной тирозинкиназой I класса, семейством ErbB или HER-семейством, объединяет группу тирозинкиназных рецепторов, регулирующих базовые клеточные процессы – пролиферацию, миграцию, выживаемость и ангиогенез. Избыточная экспрессия представителей данного семейства, появление функциональных aberrаций и сбои в регуляции нижележащих сигнальных путей прочно ассоциированы с онкогенезом [1-3]. Гиперэкспрессия EGFR (HER1 или ErbB1) регистрируется при немелкоклеточном раке лёгкого (НМРЛ), диссеминированном раке предстательной железы (РПЖ),

новообразованиях головы и шеи, а также опухолях толстой кишки и поджелудочной железы [4].

«Золотым стандартом» определения EGFR-статуса перед началом таргетного лечения остаётся биопсия с дальнейшим гистопатологическим и молекулярным исследованием полученного материала [5]. В рутинной клинической практике для этого используют молекулярно-генетические подходы – от ПЦР-тестирования до высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS), которое завоёвывает всё большее предпочтение благодаря более высокой чувствительности и возможности выявления редких генетических вариантов. Вместе с тем инвазивная биопсия сопряжена с принципиальными недостатками. Она не подходит для многократного динамического наблюдения, сопряжена с риском ложноотрицательных заключений вследствие внутриопухолевой гетерогенности [6] и, что особенно важно, не отражает интегральной картины пространственно-временной динамики экспрессии EGFR в масштабе всего организма.

Преодоление этих ограничений возможно при использовании неинвазивных подходов, в частности радионуклидной молекулярной визуализации, которая позволяет оценивать экспрессию EGFR интегрально и в динамике на уровне всего организма. Радионуклидная молекулярная визуализация экспрессии EGFR дает ряд потенциальных преимуществ по сравнению с анализом инвазивной биопсии – это связано с уменьшением вероятности ложноотрицательных результатов, вызванных несколькими факторами, такими как ошибки отбора проб, гетерогенность и несоответствие экспрессии EGFR между первичными опухолями и метастазами, а также изменения статуса EGFR во время терапии [7].

Среди малых белковых каркасов, разрабатываемых для целей молекулярной визуализации, наиболее детально охарактеризованным классом являются EGFR-специфичные аффибоди. Особенно многообещающим считается вариант Z_{EGFR:2377}, который отличается высоким сродством к рецептору и перекрёстной реактивностью в отношении мышиного EGFR, что обеспечивает адекватную оценку фонового накопления в доклинических исследованиях [8,9].

Помимо аффибоди, высокоперспективными для разработки таргетных радиофармацевтических лекарственных средств для визуализации молекулярных мишеней, в т.ч. и EGFR, являются рекомбинантные белки с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Protein, DARPIn) [10-12]. DARPins демонстрируют высокоаффинное связывание с онкомишенью. Малый размер молекулы DARPIn (14–18 кДа) способствует эффективной локализации в опухолевой ткани, что выгодно отличает их при создании диагностических радиофармпрепаратов. Кроме того, DARPins характеризуются высокой стабильностью в широких диапазонах pH и температуры, благодаря чему для их мечения радионуклидами применим широкий арсенал методик. Результаты доклинических и клинических испытаний свидетельствуют о существенном потенциале данной платформы [13,14].

Ранее наша научная группа исследовала меченый йодом-123 и технецием-99м варианты DARPIn (HE)₃-E01 с субнаномолярным сродством к EGFR, которые показали четкую визуализацию на гамма-камере EGFR-экспрессирующих опухолей. Кроме того, вариант меченый йодом-123 продемонстрировал высокие соотношения «опухоль/орган» (опухоль/кровь 3,7, опухоль/печень 1,9), что выделяет его как перспективного кандидата для дальнейшей разработки [15].

Белок DARPIn (HE)₃-E01 – это экспериментальное лекарственное средство, которое представляет собой стерильный апиогенный раствор химического предшественника, предназначенный для получения готового радиоактивного препарата. При добавлении к нему радионуклидного предшественника ^{99m}Tc или ¹²³I с последующей инкубацией при нагревании, хроматографической очисткой и стерилизацией, получается готовый к применению препарат. Качество химического предшественника должно оцениваться согласно ОФС 1.11.0005 «Химические предшественники для радиофармацевтических лекарственных препаратов» Государственной фармакопеи РФ XV издания. Методики идентификации, определения химической чистоты, количественного определения и сопутствующие испытания необходимо выполнять после проведения валидации с применением оборудования с соответствующей квалификацией. Поскольку DARPIn (HE)₃-E01 является белком, полученным методом рекомбинантных ДНК, его контроль качества дополнительно регламентируется требованиями ОФС 1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Целью исследования являлась разработка и валидация методик определения качества белка DARPIn (HE)₃-E01 – химического предшественника для получения радиофармацевтического лекарственного препарата для EGFR-направленной радионуклидной визуализации опухолей.

Материалы и методы

Получение и характеристика белка

На основе аминокислотной последовательности, размещенной в базе данных PDB, была синтезирована нуклеотидная последовательность гена, кодирующего DARPIn (HE)₃-E01. Для адаптации кодонного состава под эффективную экспрессию в клетках *Escherichia coli* применяли общедоступный программный инструмент DNABuilder. Сборку полноразмерного гена осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием синтетических олигонуклеотидов, содержащих участки взаимной комплементарности. Экспрессию белка (HE)₃-E01 проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen-EMD Millipore, США), получая рекомбинантные продукты в виде N-концевых химерных конструкций, состоящих из модифицированного SUMO-домена, ковалентно связанного с убиквитином [16]. Выделение белка из клеточной биомассы

проводили при помощи металлохелатной аффинной и ионообменной хроматографии. Аминокислотная последовательность (HE)₃-E01 имела следующий состав:

MRGSHEHEHEGSDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNAADDTWGWTPHLHAAAYQGHLEIV
EVLLKNGADVNAVDYIGWTPHLHAADGHLEIVEVLLKNGADVNASDYIGDTPHLHAAHNGHLEIVEV
LLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQKLN.

Расчетная молекулярная масса составила 18269,27 Да [17].

Хромато-масс-спектрометрия

Молекулярную массу DARP_{in} (HE)₃-E01 измеряли методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией и ионизацией электрораспылением (LC-ESI/MS). 200 нг белка наносили на самодельную ловушечную колонку 50 × 0,1 мм, заполненную Reprosil PUR 200 C18-AQ (5 мкм, Dr. Maisch), при скорости потока 4,2 мкл/мин в среде загрузочного раствора (2% ацетонитрила, 98% воды, 0,1% TFA). Разделение вели при комнатной температуре в лабораторной капиллярной колонке из плавленого кварца размером 300 × 0,1 мм, упакованной сорбентом Reprosil PUR 200 C18-AQ (1,9 мкм, Dr. Maisch) и соединённой с эмиттером, изготовленным с использованием лазерного пуллера P2000 (Sutter, США). Обращённо-фазовую хроматографию выполняли на системе Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Fisher Scientific), сопряжённой с масс-спектрометром Orbitrap Tribrid Lumos (Thermo Fisher Scientific) через источник наноэлектрораспыления (Thermo Fisher Scientific). Подвижной фазой А служила вода с 0,1% (по объёму) муравьиной кислоты (FA), а фазой Б – ацетонитрил, содержащий 0,1% FA и 20% воды. Элюирование белка с ловушечной колонки осуществляли в линейном градиенте.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Приготовление испытуемого раствора. Из раствора белка, содержащего 4,97 мг/мл белка, готовили растворы в 0,01 М фосфатном буфере (pH=7,4), с содержанием белка 0,1, 0,2, 2,0 и 4,0 мкг/мкл.

Приготовление разделяющего геля. Для приготовления 12 мл раствора разделяющего геля в чистой пробирке смешивали 4,0 мл 30%-ного акриламид/бисакриламидного раствора (30% Т, 2,6% С), 4,748 мл деионизированной воды и 3,0 мл 1,5 М Трис-НСl (гидрохлорид трис(гидроксиметил)аминометана, ООО «Диаэм», Россия) (pH 8,8). К смеси добавляли 120 мкл 10%-ного SDS (додецилсульфат натрия, ООО «Медиген», Россия). Непосредственно перед заливкой вносили 120 мкл свежеприготовленного 10%-ного персульфата аммония (ПСА) и 12 мкл ТЕМЕД. Раствор быстро, но аккуратно перемешивали и заливали в собранную кассету (между тонким и толстым стеклом), оставляя примерно 2–2,5 см до верхнего края для последующего формирования концентрирующего геля. На поверхность раствора осторожно насливали 2 мл деионизированной воды для выравнивания границы раздела. Полимеризацию проводили при комнатной температуре в течение 15–30 мин. После полного застывания воду удаляли, а остатки влаги аккуратно убирали фильтровальной бумагой.

Приготовление концентрирующего геля. Концентрирующий гель готовили аналогично: для получения 5 мл раствора концентрирующего геля смешивали 0,65 мл 30%-ного раствора акриламида 3,0 мл деионизированной воды и 1,25 мл 0,5 М Трис-HCl (pH 6,8). Затем добавляли 50 мкл 10%-ного SDS, 50 мкл 10%-ного ПСА и 5 мкл ТЕМЕД. После быстрого перемешивания раствор заливали поверх разделяющего геля до самого верха стекла. Немедленно вставляли гребёнку, стараясь избежать попадания пузырьков воздуха. Полимеризацию оставляли на 15–30 минут при комнатной температуре.

Методика. Камеру заполняли электродным буфером, содержащим трис-HCl, глицин («Медиген», Россия), додецилсульфат натрия и деминерализованную воду. В одну из лунок вносили 7 мкл маркера молекулярной массы PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США), в соседние по 10 мкл испытуемого раствора белка DARPIn (HE)₃-E0 (1, 2, 20 и 40 мкг). Разделение проводили в приборе WIX-easyPRO2 Mini Easy (WIX Technology, Китай) при постоянном напряжении 110 В в течение двух часов. Когда фронт красителя бромфенолового синего достигал нужного положения, электрофорез останавливали, а на уровне фронта делали небольшие надрезы-метки.

Гель фиксировали в 10%-й трихлоруксусной кислоте (ТХУ) в течение часа, после чего окрашивали раствором Кумасси R-250 в течение 45 минут. Избыток красителя отмывали в течение 12 часов раствором, состоящим из 7% ледяной уксусной кислоты и 10% изопропанола в воде.

Изображение геля анализировали на белом фоне с помощью программы GelAnalyzer (версия 23.1.1 для Windows, авторы: Istvan Lazar Jr., PhD и Istvan Lazar Sr., PhD, CSc). Молекулярную массу белка (HE)₃-E01 определяли, сравнивая его электрофоретическую подвижность с подвижностью белков-маркеров. Для каждой полосы измеряли расстояние от границы разделяющего геля до середины полосы. Рассчитывали относительную подвижность (R_f) как отношение этого расстояния к длине пробега фронта красителя. По полученным данным строили калибровочный график зависимости логарифма молекулярной массы стандартов от величины R_f . Предел содержания примесей рассчитывали методом количественной нормализации с использованием денситометрического интегрирования, используя программу GelAnalyzer. Предварительно определяли линейность отклика прибора с помощью раствора стандартного раствора белка DARPIn (HE)₃-E01 в диапазоне концентраций (0,1 – 20 мкг). Кроме того, для определения предела содержания белковых примесей готовили раствор сравнения с концентрацией (1 мкг/мкл) путем разбавления испытуемого раствора (4 мкг/мкл) 0,01 М фосфатным буфером (pH=7,4).

Спектрофотометрия в УФ и видимой области

Приготовление испытуемого раствора белка DARPIn (HE)₃-E01 для количественного определения. Испытуемый раствор готовят разбавлением аликвоты каждой серии исходного раствора белка (HE)₃-E01 в 0,01 М фосфатном буфере (pH=7,4) до конечной концентрации 0,5 мг/мл.

Стандартные растворы белка готовили в 0,01 М фосфатном буфере (pH=7,4) в диапазоне концентраций от 0,125 до 2,5 мг/мл. Стандартный раствор имел концентрацию DARPin (HE)₃-E01 0,5 мг/мл.

Количественное определение прямой спектрофотометрией при 280 нм. Оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов белка DARPin (HE)₃-E01 измеряли в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при длине волны 280 нм, используя в качестве фона раствор сравнения (0,01 М фосфатный буфер (pH=7,4)).

Согласно ОФС.1.2.3.0012.15 для высокоочищенных белков допускается определять концентрацию с применением удельного показателя поглощения (весового коэффициента экстинкции). Содержание DARPin (HE)₃-E01 во флаконе рассчитывали, используя теоретически рассчитанный удельный коэффициент поглощения 1,229 г·л⁻¹·см⁻¹[17].

Количественное определение колориметрическим методом с бицинхониновой кислотой. Рабочий раствор бицинхониновой кислоты (БЦА) приготавливали согласно инструкции к набору BCA Protein Assay Kit (ООО «Компания Хеликон», Россия), разводя реагенты в соотношении 1:50. Далее к аликвотам испытуемого и стандартных растворов добавляли рабочий раствор БЦА в объёмном соотношении 5:1 (20 частей белка к 100 частям рабочего реагента). Полученные смеси инкубировали в течение 30 минут при температуре 37 °С на термощейкере, после чего быстро охлаждали, измерение оптической плотности в лунках выполняли с помощью спектрофотометра Multiscan FS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) при длине волны 562 нм. В качестве контрольного раствора сравнения использовали фосфатный буфер. Расчет содержания белка DARPin (HE)₃-E01 в испытуемом растворе проводили с использованием калибровочного графика.

Результаты и их обсуждения

Для идентификации белка DARPin (HE)₃-E01 предложено использовать два метода: электрофорез в полиакриламидном геле и хромато-масс-спектрометрию. Сочетание этих методов, рекомендованных ОФС 1.11.0005, обеспечивает достаточную специфичность идентификации белка. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) также даёт возможность полуколичественной оценки содержания белковых примесей. Для количественного определения белка наиболее часто используют метод прямой спектрофотометрии при длине волны 280 нм. Помимо него, в анализе белков успешно применяют фотоколориметрические методы. В рамках контроля качества белка DARPin (HE)₃-E01 в представленной разработке прямой метод был сравнён с колориметрическим методом с бицинхониновой кислотой.

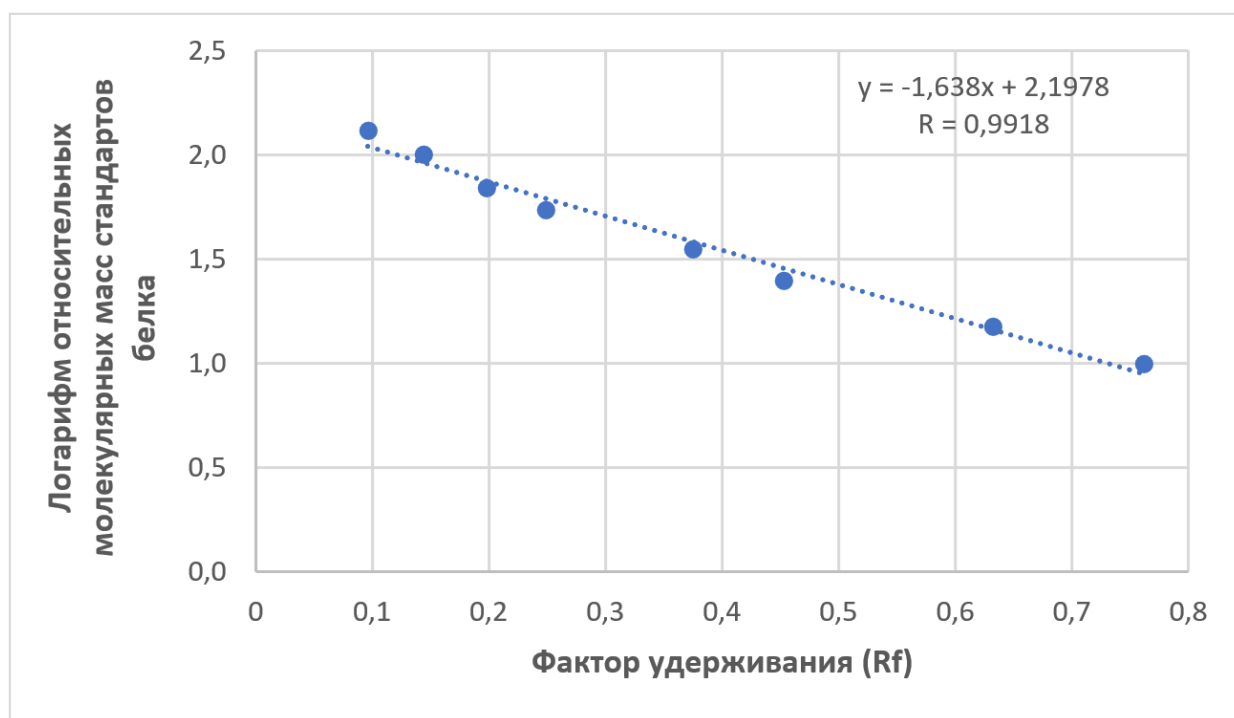
Идентификация и чистота

Подлинность DARPin (HE)₃-E01 была подтверждена методом хромато-масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. Зарегистрированная молекулярная масса соответствовала мономерной форме белка. Полученное значение молекулярной массы

продемонстрировало полное соответствие между теоретической и найденной молекулярными массами (18260,25 Да и 18260,29 Да соответственно).

Для подбора оптимальной белковой нагрузки при оценке чистоты и установления допустимого порога примесей при электрофорезе в ПААГ на гель наносили 1, 2, 20 и 40 мкг DARPin (HE)₃-E01. В выбранных условиях белок формирует визуально чёткие, компактные полосы, при этом фронт пробега белков-маркеров проходит не менее 80% длины разделяющего геля. Полученная зависимость логарифма M_r белков-маркеров от их R_f носила линейный характер (коэффициент корреляции $r > 0,99$) (см. рисунок 1). По значению R_f для полосы DARPin (HE)₃-E01, которое составило $0,574 \pm 0,015$, методом обратного логарифмирования рассчитывали молекулярную массу. Получено значение равное 18,1 кДа ($n = 4$, относительное стандартное отклонение 10 %). Для надёжного детектирования примесных компонентов в лунку необходимо вносить не менее 20 мкг белка в объёме 4 мкл исходного раствора. При этом на электрофореграмме, помимо основной полосы, допустимо присутствие дополнительных минорных полос. Совокупность интенсивности и размера полос примесей на электрофореграмме с испытуемым препаратом не должны быть интенсивнее, чем полоса, полученная с раствором сравнения (1 мкг/мкл). Анализ пяти серий образцов показал, что содержание примесей, определяемое методом электрофореза в ПААГ, не превышало 1 %. Предел содержания белковых примесей предложено определить как «не более 2,5 %».

Рисунок 1. График линейной регрессии относительных молекулярных масс (M_r) белков-маркеров от значений их факторов удерживания R_f , в диапазоне 10-130 кДА



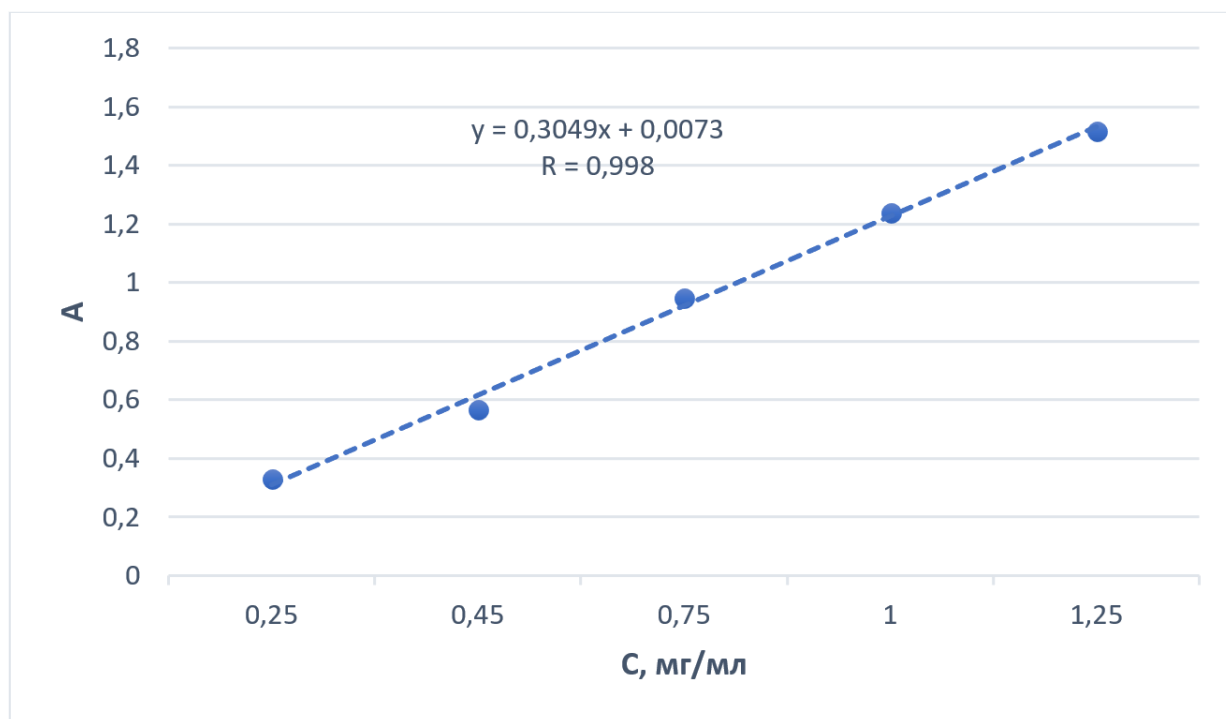
Валидация методики количественного определения белка DARPin (HE)₃-E01 методом спектрофотометрии при 280 нм

Специфичность. В составе DARPin (HE)₃-E01 присутствуют хромофорные аминокислотные остатки триптофана (3) и тирозина (4), благодаря которым белок избирательно поглощает ультрафиолетовое излучение на длине волны 280 нм. Буферные соли раствора собственного поглощения в данной области спектра не имеют и на результаты анализа не влияют. Метод рекомендуется включить в проект нормативной документации для количественного контроля DARPin (HE)₃-E01.

Линейность. Линейность методики проверяли на пяти стандартных растворах DARPin (HE)₃-E01, охватывающих диапазон концентраций от 0,25 до 1,5 мг/мл. Каждый раствор анализировали пятикратно, после чего для каждой точки вычисляли среднюю оптическую плотность. По полученным данным строили график зависимости оптической плотности (y) от концентрации (x , мг/мл). Наблюдалась линейная зависимость с коэффициентом корреляции 0,998, описываемая уравнением $y = 0,3049x + 0,0073$ (см. рисунок 2). Это подтверждает линейность методики в исследованном интервале концентраций.

Для расчёта концентрации белка в испытуемом растворе предлагается использовать экспериментально установленный удельный коэффициент поглощения. Среднее значение удельного коэффициента поглощения, определенное с использованием стандартных растворов белка, составило $1,229 \pm 0,02 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Полученная величина согласуется с теоретическим значением ($1,229 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [18].

Рисунок 2. График зависимости оптической плотности DARPin (HE)₃-E01 от концентрации



Правильность методики оценивали методом добавок с использованием трёх модельных растворов, концентрации которых составляли 80, 100 и 120 % от номинального значения. Всего выполняли девять определений (по три параллельных измерений для каждого уровня концентрации). В качестве добавки использовали стандартный раствор DARPIn (HE)₃-E01 с концентрацией 0,5 мг/мл. Полученные коэффициенты вариации не превышали 2 % во всём изученном диапазоне, что подтверждает соответствие методики критерию правильности (таблица 1).

Таблица 1. Оценка правильности методики определения содержания DARPIn (HE)₃-E01

Номер модельного раствора	Введено белка, %	Найдено белка $\bar{x}$, мг/мл	S	$S_{\bar{x}}$	CV, %	$\Delta \bar{x}$
1	80	0,40	0,003	0,001	0,8	0,003
2	100	0,50	0,004	0,001	0,8	0,003
3	120	0,60	0,004	0,002	0,8	0,004

Сходимость оценивали по результатам анализа девяти образцов DARPIn (HE)₃-E01 одной серии, выполненных одним аналитиком в течение одного рабочего дня, CV не превышает 1 %. *Внутрилабораторную прецизионность* определяли путём выполнения девяти определений для каждой из 3 концентраций, другим аналитиком лаборатории в другой день. Соответствующие данные приведены в таблице 2. Расчётное содержание DARPIn (HE)₃-E01 в растворе составило $0,50 \pm 0,003$ мг/мл.

Таблица 2. Оценка прецизионности методики определения содержания DARPIn (HE)₃-E01

	$\bar{x}$	f	S	$S_{\bar{x}}$	RSD $_{\bar{x}}$, %	p	$t_{(p, f)}$	$\Delta \bar{x}$
Аналитик 1	0,50	8	0,004	0,001	0,8	0,95	2,31	0,003
Аналитик 2	0,40	8	0,004	0,001	1,0	0,95	2,31	0,003
	0,50	8	0,003	0,001	0,7	0,95	2,31	0,003
	0,60	8	0,005	0,005	0,9	0,95	2,31	0,004

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 (CV – коэффициент вариации); p – уровень значимости; $t_{(p, f)}$ – критерий Стьюдента; $\Delta \bar{x}$ – полуширина доверительного интервала неопределенности среднего результата.

Валидация методики количественного определения белка DARPIn (HE)₃-E01 методом с бицинхониновой кислотой

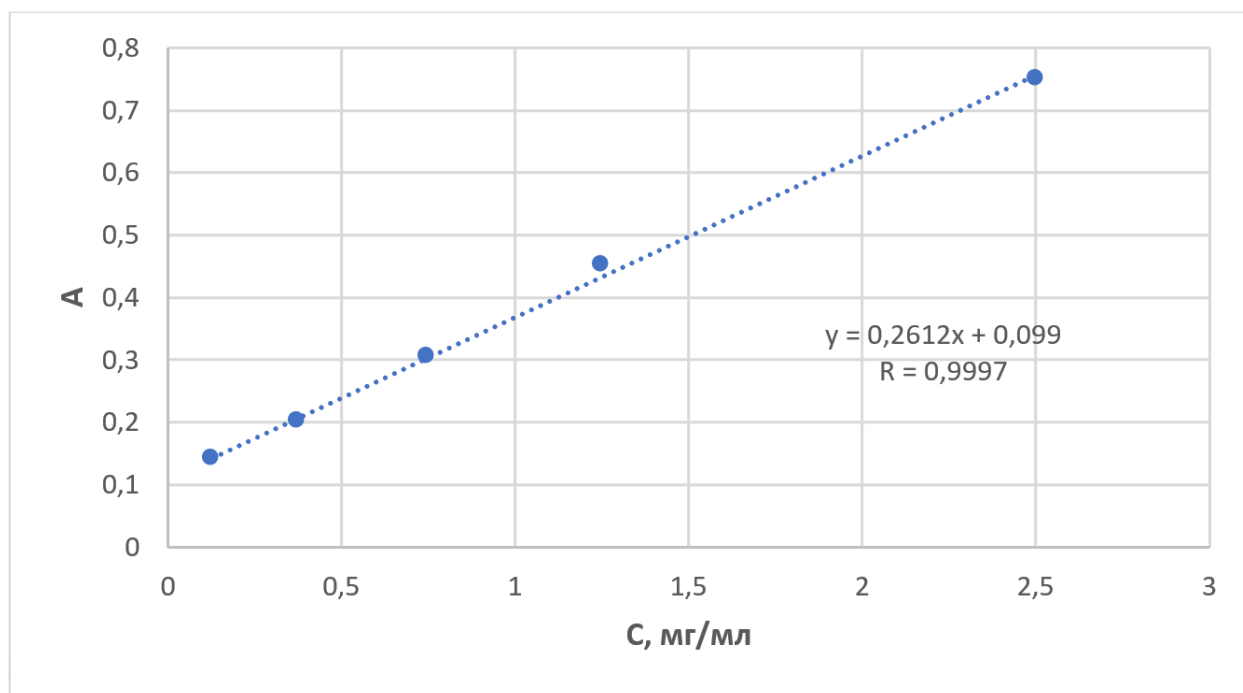
Валидацию методики проводили аналогично методике, описанной выше.

Специфичность. Специфичность методики обеспечивается химизмом биуретовой реакции и применением в качестве стандартного образца самого DARPIn (HE)₃-E01, что гарантирует идентичность состава стандарта и анализируемого белка. Сигнал холостой пробы вычитали из аналитического сигнала рабочих и контрольных растворов. Скорректированные

значения использовали для построения калибровочного графика и расчёта концентрации, это исключает вклад компонентов буфера.

Линейность. Коэффициент корреляции (r) составил 0,9997, что подтверждает линейную зависимость аналитического сигнала от концентрации белка (HE)₃-E01 в исследуемом диапазоне (см. рисунок 3).

Рисунок 3. График зависимости оптической плотности DARPIn (HE)₃-E01 от концентрации (колориметрический метод)



Правильность. Рассчитанные коэффициенты вариации не превышали 2 % в диапазоне концентраций 80–120 %, что подтверждает валидность методики по параметру «правильность» (таблица 3).

Сходимость и внутрилабораторная прецизионность. Коэффициенты вариации при определении прецизионности составили не более 2 %, что подтверждает хорошую повторяемость. *Внутрилабораторную прецизионность* определяли путём выполнения девяти определений для каждой из 3 концентраций, другим аналитиком лаборатории в другой день. Соответствующие данные приведены в таблице 4. Расчётное содержание DARPIn (HE)₃-E01 в растворе составило $0,49 \pm 0,06$ мг/мл.

Таблица 3. Результаты определения правильности методики (HE)₃-E01

Номер модельного раствора	Введено белка %	Найдено белка $\bar{x}$, мг/мл	S	$S_{\bar{x}}$	CV, %	$\Delta \bar{x}$
1	80	0,39	0,006	0,003	1,6	0,005
2	100	0,49	0,006	0,002	1,3	0,005
3	120	0,60	0,010	0,003	1,7	0,008

Таблица 4. Оценка прецизионности методики определения содержания (HE)₃-E01

	$\bar{x}$	f	S	$S_{\bar{x}}$	$RSD_{\bar{x}}$, %	p	$t_{(p, f)}$	$\Delta\bar{x}$
Аналитик 1	0,49	8	0,01	0,004	1,3	0,95	2,31	0,005
Аналитик 2	0,40	8	0,007	0,003	1,8	0,95	2,31	0,006
	0,49	8	0,006	0,002	1,2	0,95	2,31	0,005
	0,59	8	0,008	0,003	1,3	0,95	2,31	0,006

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 (CV - коэффициент вариации); p – уровень значимости; $t_{(p, f)}$ – критерий Стьюдента; $\Delta\bar{x}$ – полуширина доверительного интервала неопределенности среднего результата.

Для сравнения двух методик использовали F-критерий Фишера (проверка однородности дисперсий) и t-критерий Стьюдента для независимых выборок с объединённой дисперсией (проверка равенства средних) при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Для образца с концентрацией 100 % (0,5 мг/мл) средние содержания белка, полученные методом УФ-280 и методом BCA, составили $0,50 \pm 0,03$ и $0,49 \pm 0,06$ (см. таблицу 5). Расчётное значение F-критерия $F = 3,10$ не превысило критическое $F_{(0,95; 8, 8)} = 3,44$, следовательно, дисперсии (воспроизводимость) методик статистически не различаются ($p > 0,05$).

Поскольку дисперсии однородны, сравнение средних проводили с помощью t-критерия Стьюдента с объединённой оценкой дисперсии. Экспериментальное значение t-критерия Стьюдента = 1,68 оказалось меньше табличного $t_{(0,95; 16)} = 2,12$, что указывает на отсутствие статистически значимых различий между средними.

Таким образом, обе методики обеспечивают сопоставимые результаты как по прецизионности, так и по правильности определения белка.

Таблица 5. Сравнение результатов количественного определения белка спектрофотометрическим и колориметрическим методами

Параметр	Метод 1 ¹	Метод 2 ²
$\bar{x}$, мг/мл	0,50	0,49
S	0,003	0,006
$RSD_{\bar{x}}$, %	0,7	1,2
Доверительный интервал ($P=0,95$), мг/мл	$0,50 \pm 0,003$	$0,49 \pm 0,005$

Примечание. ¹ Метод 1 метод спектрофотометрии при 280 нм., ² Метод 2 - метод с бицинхониновой кислотой. $\bar{x}$ – среднее значение; S – стандартное отклонение; $RSD_{\bar{x}}$ – относительное стандартное отклонение среднего результата, выраженное в процентах.

Заключение

Для подтверждения подлинности и чистоты нового химического предшественника – белка DARPin (HE)₃-E01, предназначенного для приготовления меченных технецием-99m и йодом-123 препаратов для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии EGFR в злокачественных новообразованиях, предложено использовать два метода: хромато-масс-спектрометрию и электрофорез в полиакриламидном геле. Количественное определение белка может выполняться как с помощью УФ-спектрофотометрии, так и колориметрическим методом с БЦА. Установлено, что методики количественного определения соответствует требованиям, предъявляемым к валидации в фармацевтическом анализе, и могут быть включены в проект нормативной документации для контроля качества химического предшественника белка DARPin (HE)₃-E01.

Список литературы

1. Wang Z. ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol.* 2017;1652:3-35. doi: 10.1007/978-1-4939-7219-7_1.
2. Kumar R, George B, Campbell MR, Verma N, Paul AM, Melo-Alvim C, Ribeiro L, Pillai MR, da Costa LM, Moasser MM. HER family in cancer progression: From discovery to 2020 and beyond. *Adv Cancer Res.* 2020;147:109-160. doi: 10.1016/bs.acr.2020.04.001.
3. Roskoski R Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res.* 2014 Jan;79:34-74. doi: 10.1016/j.phrs.2013.11.002. Epub 2013 Nov 20.
4. Thomas R, Weihua Z. Rethink of EGFR in Cancer With Its Kinase Independent Function on Board. *Front Oncol.* 2019 Aug 23;9:800. doi: 10.3389/fonc.2019.00800.
5. Yanev N, Mekov E, Valev D, Yankov G, Milanov V, Bichev S, Gabrovska N, Kostadinov D. EGFR mutation status yield from bronchoalveolar lavage in patients with primary pulmonary adenocarcinoma compared to a venous blood sample and tissue biopsy. *PeerJ.* 2021 May 14;9:e11448. doi: 10.7717/peerj.11448.
6. Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SL, Tokuda Y, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Ueno NT. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol.* 2012 Feb 20;30(6):593-9. doi: 10.1200/JCO.2010.33.8889.
7. Tolmachev V, Rosik D, Wållberg H, Sjöberg A, Sandström M, Hansson M, Wennborg A, Orlova A. Imaging of EGFR expression in murine xenografts using site-specifically labelled anti-EGFR ¹¹¹In-DOTA-Z EGFR₂₃₇₇ Affibody molecule: aspect of the injected tracer amount. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010 Mar;37(3):613-22. doi: 10.1007/s00259-009-1283-x.
8. Burley TA, Da Pieve C, Martins CD, Ciobota DM, Allott L, Oyen WJG, Harrington KJ, Smith G, Kramer-Marek G. Affibody-Based PET Imaging to Guide EGFR-Targeted Cancer Therapy in Head and Neck Squamous Cell Cancer Models. *J Nucl Med.* 2019 Mar;60(3):353-361. doi: 10.2967/jnumed.118.216069.
9. Garousi J, Andersson KG, Mitran B, Pichl ML, Ståhl S, Orlova A, Löfblom J, Tolmachev V. PET imaging of epidermal growth factor receptor expression in tumours using ⁸⁹Zr-labelled ZEGFR:2377 affibody molecules. *Int J Oncol.* 2016 Apr;48(4):1325-32. doi: 10.3892/ijo.2016.3369.
10. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:489-511. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654.
11. Deyev SM, Xu T, Liu Y, Schulga A, Konovalova E, Garousi J, Rinne SS, 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 (Basel).* 2021 Jul 17;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 SM, 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 (Basel).* 2024 Aug 10;16(16):2815. doi: 10.3390/cancers16162815.

13. Larkina M, Plotnikov E, Bezverkhniia E, Shabanova Y, Tretyakova M, Yuldasheva F, Zelchan R, Schulga A, Konovalova E, Vorobyeva A, Garousi J, Gräslund T, Belousov M, Tolmachev V, Deyev S. Comparative Preclinical Evaluation of Peptide-Based Chelators for the Labeling of DARPIn G3 with ^{99m}Tc for Radionuclide Imaging of HER2 Expression in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 3;23(21):13443. doi: 10.3390/ijms232113443.
14. Deyev S, Fominykh A, Varvashenya R, Yanovich G, Bodenko V, Plotnikov E, Tretyakova M, Eskova D, Zhelchan R, Schulga A, Konovalova E, Ziganshin R, Orlova A, Belousov M, Tolmachev V, Larkina M. The Use of Glycine-Containing Peptide-Based Chelators for Labeling with ^{99m}Tc Improves the Imaging Properties of EpCAM-Targeting Designed Ankyrin Repeat Ec1. *Mol Pharm.* 2026 Apr 6;23(4):2469-2480. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5c01498.
15. Larkina M, Yanovich G, Hasnowo LA, Varvashenya R, Yuldasheva F, Tretyakova M, Plotnikov E, Zelchan R, Schulga A, Konovalova E, Ziganshin R, Belousov MV, Tolmachev V, Deyev SM. Comparative Preclinical Evaluation of the Tumor-Targeting Properties of Radioiodine and Technetium-Labeled Designed Ankyrin Repeat Proteins for Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Malignant Tumors. *Int J Mol Sci.* 2025 Oct 31;26(21):10609. doi: 10.3390/ijms262110609.
16. Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics.* 2004;5(1-2):75-86. doi: 10.1023/B:JSFG.0000029237.70316.52.
17. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem.* 1989 Nov 1;182(2):319-26. doi: 10.1016/0003-2697(89)90602-7.

Development and Validation of Methods for Assessing the Quality of a Chemical Precursor—a Recombinant Protein Based on Ankyrin Repeats—for EGFR-Targeted Radionuclide Tumor Imaging

Yanovich G. E. ^{1,2}

postgraduate student, Department of Pharmaceutical Analysis, engineer

Prach A. A. ²

engineer

Kadyrova T. V. ¹

PhD in Pharm. Sci., Associate Professor, Department of Pharmaceutical Analysis

Krivoshchekov S. V. ¹

PhD in Chem. Sci., Associate Professor, Department of Pharmaceutical Analysis

Shulga A. A. ^{2,3}

PhD in Biol. Sci., senior researcher, leading researcher

Konovalova E. V. ^{2,3}

engineer, junior researcher

Ziganshin R. Kh. ³

senior researcher

Deev S. M. ^{2,3}

Doctor of Biol. Sci., leading researcher

Belousov M. V. ^{1,2}

Doctor of Pharm. Sci., Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, Professor, Engineering School of Chemical and Biomedical Technologies

Larkina M. S. ^{1,2}

Doctor of Pharm. Sci., Professor, Department of Pharmaceutical Analysis, senior researcher

¹ Siberian State Medical University (SibMed), 2, Moskovsky Trakt, Tomsk, 634050, Russia

² National Research Tomsk Polytechnic University (TPU), 30, Lenin Ave., Tomsk, 634050, Russia

³ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 16/10, Miklukho-Maklaya St., GSP-7, Moscow, 117997, Russia

Corresponding author: Gleb E. Yanovich, **e-mail:** sonne_gleb@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 09.05.2026

Accepted: 10.06.2026

Abstract

Introduction. Overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) is characteristic of a number of malignant neoplasms, making it an important molecular target for targeted radionuclide imaging. The designed ankyrin repeat protein DARPIn (HE)₃-E01 with subnanomolar affinity to EGFR is considered as a promising chemical precursor for the preparation of radiopharmaceuticals labeled with technetium-99m or iodine-123. To be introduced into pharmaceutical practice, a set of validated quality control methods for this protein is required. **Objective.** To develop and validate methods for identification, purity assessment, and quantification of the DARPIn (HE)₃-E01 protein. **Materials and Methods.** Identity was confirmed by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI/MS) and sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Quantification was performed using direct UV spectrophotometry at 280 nm and the bicinchoninic acid (BCA) colorimetric assay. Validation was conducted according to the criteria of specificity, linearity, accuracy (standard addition method), and precision (repeatability, intermediate precision). The two quantitative methods were compared using the F-test and t-test. **Results.** Mass spectrometric analysis showed complete agreement between the experimental molecular mass (18,260.29 Da) and the theoretically expected value (18,260.25 Da). Electrophoretic determination of molecular weight gave a value of 18.1 kDa, and the protein purity was at least 99%, with impurity content not exceeding 1%. Both quantitative methods demonstrated linearity over the studied concentration range (correlation coefficients of 0.9979 and 0.9997), high accuracy (CV not more than 2% for both methods), and precision (RSD <2%). No statistically significant differences were found between the results of the two methods ($p > 0.05$). **Conclusion.** The developed methods for identification and quantification of DARPIn (HE)₃-E01 have been successfully validated and can be included in the draft regulatory documentation for quality control of the chemical precursor intended for the preparation of EGFR-targeted radiopharmaceuticals.

Keywords: DARPIn, EGFR, chemical precursor, quality control, method validation

References

1. Wang Z. ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol.* 2017;1652:3-35. doi: 10.1007/978-1-4939-7219-7_1.
2. Kumar R, George B, Campbell MR, Verma N, Paul AM, Melo-Alvim C, Ribeiro L, Pillai MR, da Costa LM, Moasser MM. HER family in cancer progression: From discovery to 2020 and beyond. *Adv Cancer Res.* 2020;147:109-160. doi: 10.1016/bs.acr.2020.04.001.
3. Roskoski R Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res.* 2014 Jan;79:34-74. doi: 10.1016/j.phrs.2013.11.002. Epub 2013 Nov 20.
4. Thomas R, Weihua Z. Rethink of EGFR in Cancer With Its Kinase Independent Function on Board. *Front Oncol.* 2019 Aug 23;9:800. doi: 10.3389/fonc.2019.00800.
5. Yanev N, Mekov E, Valev D, Yankov G, Milanov V, Bichev S, Gabrovska N, Kostadinov D. EGFR mutation status yield from bronchoalveolar lavage in patients with primary pulmonary adenocarcinoma compared to a venous blood sample and tissue biopsy. *PeerJ.* 2021 May 14;9:e11448. doi: 10.7717/peerj.11448.
6. Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SL, Tokuda Y, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Ueno NT. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol.* 2012 Feb 20;30(6):593-9. doi: 10.1200/JCO.2010.33.8889.
7. Tolmachev V, Rosik D, Wållberg H, Sjöberg A, Sandström M, Hansson M, Wennborg A, Orlova A. Imaging of EGFR expression in murine xenografts using site-specifically labelled anti-EGFR ¹¹¹In-DOTA-Z EGFR₂₃₇₇ Affibody molecule:

aspect of the injected tracer amount. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010 Mar;37(3):613-22. doi: 10.1007/s00259-009-1283-x.

8. Burley TA, Da Pieve C, Martins CD, Ciobota DM, Allott L, Oyen WJG, Harrington KJ, Smith G, Kramer-Marek G. Affibody-Based PET Imaging to Guide EGFR-Targeted Cancer Therapy in Head and Neck Squamous Cell Cancer Models. *J Nucl Med*. 2019 Mar;60(3):353-361. doi: 10.2967/jnumed.118.216069.

9. Garousi J, Andersson KG, Mitran B, Pichl ML, Ståhl S, Orlova A, Löfblom J, Tolmachev V. PET imaging of epidermal growth factor receptor expression in tumours using ⁸⁹Zr-labelled ZEGFR:2377 affibody molecules. *Int J Oncol*. 2016 Apr;48(4):1325-32. doi: 10.3892/ijo.2016.3369.

10. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015;55:489-511. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654.

11. Deyev SM, Xu T, Liu Y, Schulga A, Konovalova E, Garousi J, Rinne SS, 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 (Basel)*. 2021 Jul 17;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 SM, 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 (Basel)*. 2024 Aug 10;16(16):2815. doi: 10.3390/cancers16162815.

13. Larkina M, Plotnikov E, Bezverkhniaia E, Shabanova Y, Tretyakova M, Yuldasheva F, Zelchan R, Schulga A, Konovalova E, Vorobyeva A, Garousi J, Gräslund T, Belousov M, Tolmachev V, Deyev S. Comparative Preclinical Evaluation of Peptide-Based Chelators for the Labeling of DARPin G3 with ^{99m}Tc for Radionuclide Imaging of HER2 Expression in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 3;23(21):13443. doi: 10.3390/ijms232113443.

14. Deyev S, Fominykh A, Varvashenya R, Yanovich G, Bodenko V, Plotnikov E, Tretyakova M, Eskova D, Zhelchan R, Schulga A, Konovalova E, Ziganshin R, Orlova A, Belousov M, Tolmachev V, Larkina M. The Use of Glycine-Containing Peptide-Based Chelators for Labeling with ^{99m}Tc Improves the Imaging Properties of EpCAM-Targeting Designed Ankyrin Repeat Ec1. *Mol Pharm*. 2026 Apr 6;23(4):2469-2480. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5c01498.

15. Larkina M, Yanovich G, Hasnowo LA, Varvashenya R, Yuldasheva F, Tretyakova M, Plotnikov E, Zelchan R, Schulga A, Konovalova E, Ziganshin R, Belousov MV, Tolmachev V, Deyev SM. Comparative Preclinical Evaluation of the Tumor-Targeting Properties of Radioiodine and Technetium-Labeled Designed Ankyrin Repeat Proteins for Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Malignant Tumors. *Int J Mol Sci*. 2025 Oct 31;26(21):10609. doi: 10.3390/ijms262110609.

16. Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics*. 2004;5(1-2):75-86. doi: 10.1023/B:JSFG.0000029237.70316.52.

17. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*. 1989 Nov 1;182(2):319-26. doi: 10.1016/0003-2697(89)90602-7.