

## СИНТЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ НЕИММУНОГЛОБУЛИНОВОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ ОНКОЛОГИИ

### Обзор

© 2023 Т.И. Дэвид<sup>1,2</sup>, Н.Б. Пестов<sup>1,3,4\*</sup>, Т.В. Корнеев<sup>4</sup>, Н.А. Барлев<sup>1,3,5,6</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121 Москва, Россия; электронная почта: payeoff@yahoo.com

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, Физтех-школа биологической и медицинской физики,  
лаборатория молекулярной онкологии, 141701 Московская область, Долгопрудный, Россия

<sup>3</sup> Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических  
препаратов им. М.П. Чумакова РАН, лаборатория клещевого энцефалита  
и других вирусных энцефалитов, 108819 Москва, поселение Московский, Россия

<sup>4</sup> Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
группа кросс-сшивающих ферментов, 117997 Москва, Россия

<sup>5</sup> Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup> Назарбаев университет, медицинский факультет, 010000 Астана, Казахстан

Поступила в редакцию 06.06.2023

После доработки 01.08.2023

Принята к публикации 01.08.2023

Благодаря широкому распространению скрининга комбинаторных библиотек при помощи таких методов, как фаговый дисплей, стало возможным не только осуществлять разработки новых рекомбинантных антител, но и расширить арсенал белков, связывающих интересующие мишени, за счёт многих других полипептидных скаффолдов-каркасов, негомологичных иммуноглобулинам. Такие новые синтетические связывающие белки (ССБ) в настоящее время довольно разнообразны; к ним относятся монотела/аднектины, дарпины, липокалины/антикалины и многочисленные минипротейны (аффитела, кноттины) и другие структуры, используемые в качестве модулей для создания более сложных аффинных инструментов с потенциалом применения как в диагностике, так и в терапии. Удачные скаффолды должны иметь небольшую молекулярную массу, обладать низкой иммуногенностью, а также резистентностью к различным жёстким условиям, например, к протеолизу (то есть иметь перспективу перорального применения); предпочтительно сохранение работоспособности в восстановительных условиях внутриклеточной среды. Но главное — это устойчивость скаффолда к мутациям в значительном количестве позиций, что необходимо для создания области связывания мишени достаточного размера через приготовление библиотек и скрининг с последующей препаративной экспрессией в подходящей системе. Поэтому скаффолды с высокой термодинамической стабильностью в настоящее время особенно привлекательны для создания новых ССБ, которые уже постепенно входят в клиническую практику как антагонисты онкопротеинов в сигнальных каскадах. Настоящий обзор посвящён многообразию ССБ с особым вниманием к тем из них, которые ингибируют важнейший онкопротеин KRAS, разработка специфических ингибиторов против мутантов которого до недавнего времени была затруднена.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** монотела, аднектины, липокалины, аффитела, дарпины, альтернативные скаффолды.

**DOI:** 10.31857/S032097252309004X, **EDN:** WTGRQC

### ВВЕДЕНИЕ

Трансформация нормальной клетки в раковую определяется несколькими молекуляр-

ными событиями, которые включают прямую или косвенную активацию онкогенов и/или потерю функции супрессоров опухоли. Эти события сопровождаются изменениями в регуляции экспрессии генов, приводя к усилению клеточной пролиферации, репликативному бессмертию и понижению чувствительности к противоопухолевому иммунитету. В поисках эффективных терапевтических средств

Принятые сокращения: а.о. — аминокислотный остаток; ОВ — онколитические вирусы; ССБ — синтетические связывающие белки.

\* Адресат для корреспонденции.

разработано значительное число адресных препаратов, применяемых на практике и представленных в основном в двух вариантах: моноклональные антитела, которые действуют в основном как блокаторы рецепторов на опухолевых клетках, и низкомолекулярные вещества, которые ингибируют в основном протеинкиназы, опосредующие внутриклеточные сигнальные пути, важные для роста и инвазивности раковых клеток. Исследования механизма действия антител, конъюгированных с токсичными низкомолекулярными ингибиторами, а также нацеливание клеточных и вирусных противоопухолевых средств в настоящее время являются одним из самых перспективных направлений современной молекулярной онкологии. Трудности, связанные с лечением рака, во многом обусловлены адаптивной резистентностью опухолей в результате действия молекулярных механизмов, которые приводят к общему повышению агрессивности опухолей; одним из таких механизмов является генетическая гетерогенность опухолевых клеток, ведущая к тому, что многие препараты неспособны воздействовать на все популяции опухолевых клеток. Чем выше селективность ингибитора, тем быстрее развивается устойчивость к нему из-за высокой частоты мутаций и эпигенетической пластичности раковых клеток. Поэтому высокоэффективные препараты будущего не должны быть узкоспецифичными, а должны охватывать весь класс близкородственных молекул-мишеней, то есть необходима разработка терапевтических стратегий всё возрастающей сложности.

В данном обзоре мы концентрируемся на применении *синтетических связывающих белков* (ССБ, называемых также миметиками или даже имитаторами антител, что не вполне корректно), содержащих неиммуноглобулиновые скаффолды (скаффолд или каркас здесь — одnodоменный полипептид в примерном диапазоне масс 4–20 кДа), в онкологии, а также рассматриваем проблемы их разработки и продукции, которые пока являются одним из препятствий на пути их широкого внедрения в различные сферы науки и здравоохранения. Это особенно актуально в связи с тем, что со времени публикации наиболее широко охватывающего проблематику и очень вдумчивого обзора прошло уже десять лет [1].

## ДОСТОИНСТВА И НЕДОСТАТКИ АНТИТЕЛ

Наиболее универсальными и разнообразными связывающими белками у человека яв-

ляются иммуноглобулины. Их антиген-связывающие участки состоят из шести петель, соединяющих нити  $\beta$ -листов в переменных доменах лёгких и тяжёлых цепей. В настоящее время классические антитела доминируют среди белковых препаратов от фундаментальных научных исследований до практической адресной терапии. Необходимо тщательно взвесить как достоинства, так и недостатки иммуноглобулинов. На сегодняшний день они являются лучшими инструментами благодаря своим превосходным свойствам: они естественны по своему происхождению, принадлежат к основным белкам плазмы, они могут обладать отличным сродством и специфичностью к желаемым мишеням, их крупномасштабное производство хорошо налажено, разработаны простые протоколы конъюгации и т.д. Большого прогресса удалось достичь благодаря применению антител верблюда и ламы, поскольку они сохраняют свойства иммуноглобулинов и без лёгких цепей, что позволяет — под именем *нанотела* — также применять их и внутриклеточно. Однако в этом отношении они уступают многим другим ССБ на основе альтернативных скаффолдов, которые могут быть отобраны и сконструированы для точного воздействия на внутриклеточные онкопротеины, включая те, которые ранее считались не поддающимися ингибированию, например, GTPазу KRAS. В этой связи надо заметить, что, хотя использование моноклональных антител, в сравнении с низкомолекулярными химическими ингибиторами, оказалось более мощным средством против опухолевых клеток благодаря высокой специфичности к своей мишени, большая молекулярная масса (около 150 кДа) ограничивает их применение в части воздействия на внутриклеточные белки. Другие недостатки антител накладывают серьёзные ограничения на некоторые другие способы их использования, например, наличие дисульфидных мостиков затрудняет их применение для адресных подходов во внутриклеточной восстановительной среде. Важна также и высокая стоимость антител. Кроме того, из-за большого размера, медленного выведения из крови и неопухолевых тканей антитела менее пригодны для таких областей, как визуализация опухолей или радиоиммунотерапия. Уменьшение размера могло бы дать ряд преимуществ, например, увеличение доступности стерически затруднённых эпитопов. Также важно снижение гидрофобности, склонности к агрегации, а повышение стабильности самого скаффолда вне зависимости от редокс-потенциала является приоритетом. Поэтому остро стоит задача создания

белковых аналогов антител, обладающих высокой аффинностью, но меньшей молекулярной массой, лёгкостью продукции, высокой стабильностью снаружи и внутри клетки.

### ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О РАЗНООБРАЗИИ НЕИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

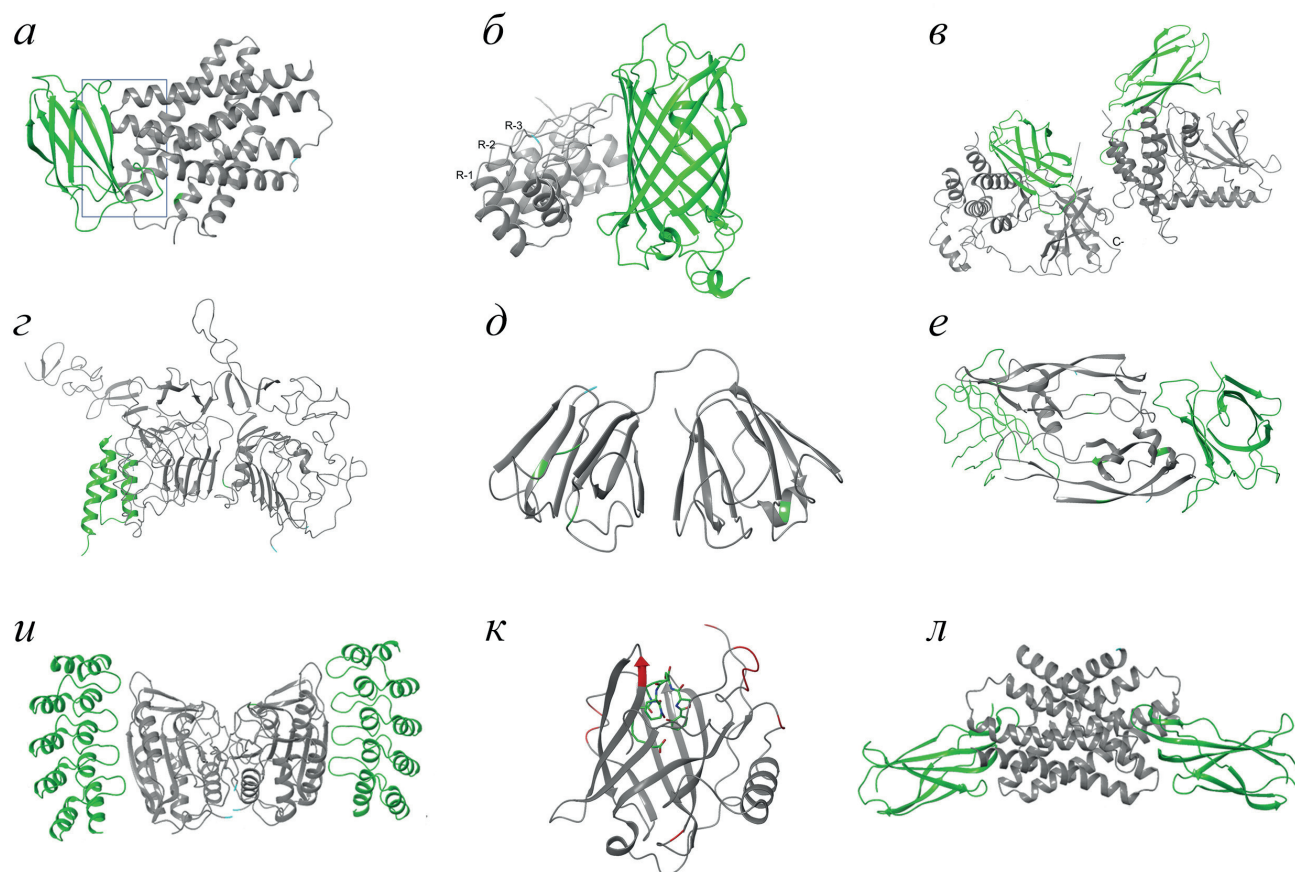
Достаточно очевидным соображением является необходимость компромисса между различными свойствами. Например, значительное повышение аффинности может быть достигнуто ценой ущерба для других важных параметров — особенно специфичности, но также зачастую и стабильности (их оптимизировать без компромиссов невозможно [2], что особенно хорошо показано на примере антител [3]), поэтому надо кратко рассмотреть пути оптимизации свойств в случае альтернативных скаффолдов ССБ. В самом деле, все моноклональные антитела в любом случае фактически являются полиспецифичными, способными связываться с эпитопами со значительно отличающейся геометрией [4, 5].

Порой возможно на основании простых фактов спрогнозировать и наметить пути к улучшению свойств ССБ, в которых зачастую много остатков лизина и аргинина: в случае антител это сильно ухудшает свойства [6], поэтому для внутриклеточного применения ССБ можно по аналогии предположить, что они будут способны неспецифически связываться с нуклеиновыми кислотами. Порой ставится вопрос о необходимости уменьшения сложности взаимодействий путём минимизации как самого молекулярного скаффолда-каркаса, так и поверхности взаимодействий. ССБ должны быть хорошими блоками молекулярного конструктора для комбинаторного подхода в создании мультифункциональных молекул. Можно рекомендовать ряд прекрасных обзоров альтернативных скаффолдов ССБ, упомянем только самые недавние — опубликованные за последние 4 года и описывающие перспективные ССБ в терапии [7], в биологии развития [8], для нейтрализации токсинов [9], для пуллаута с последующим масс-спектрометрическим анализом терапевтически важных белков и биомаркеров [10]. Основная цель нашего обзора состоит в том, чтобы рассмотреть разработки многообразных ССБ под углом перспектив их применения в онкологии.

Поиск новых вариантов ССБ обычно производится через создание рандомизированных

библиотек с последующей селекцией, анализом клонов и завершается рациональным дизайном, то есть хороший скаффолд ССБ должен позволять существенное варьирование остатков, формирующих сайт связывания своей мишени. Разумно классифицировать уже созданные платформы (рис. 1) по структурному принципу формирования связывающей поверхности на две большие группы: спирально-цепного типа (дарпины, минипротейины (включая аффитела), аффилины и другие) и петлевого типа (монотела, антикарины, авимеры, кноттины, атримеры, финомеры и другие, включая также и иммуноглобулины). Это различие очень важно, поскольку в первом типе для создания библиотек новых вариантов рандомизируются остатки, боковые цепи которых экспонированы наружу, в то время как во втором типе сам скаффолд чаще всего не затрагивается, но петли варьируются очень сильно, в том числе и по своей длине. По всей видимости, за исключением циклических минипротейинов, во всех реализованных вариантах свободны *N*- и *C*-концы, что даёт возможность слияния с другими последовательностями. До сих пор не используются такие элементы, как внутренне неупорядоченные белки [11], и очень слабо — PDZ-домен [12], так как основным требованием для хороших скаффолдов является термодинамическая стабильность. Поскольку монотела, дарпины, антикарины и аффитела в настоящее время наиболее популярны [13, 14], то их следует рассмотреть отдельно, а здесь кратко упомянуть остальные скаффолды, подчеркнув, что многие попытки создать новую продуктивную платформу на основе нового скаффолда могут показаться тупиковыми, такие как тендаминат [15].

Минипротейины условно определяются как белки с массой существенно меньше 10 кДа, к ним следует относить и аффитела (рассмотрены ниже). Характерный малый размер позволяет использовать для препаративного получения химический синтез, в своём огромном разнообразии они освещены в специальном обзоре [16]. Здесь нам следует упомянуть прототипического представителя минипротейинов: *кноттины* (knottins) [17] (размер применяемых кноттинов начинается с 14 аминокислотных остатков (а.о.), но чаще всего составляет около 30 а.о.), которые особенно ярко характеризуются чертой, распространённой среди минипротейинов — стабилизацией большим количеством дисульфидов. В кноттинах три антипараллельные  $\beta$ -цепи соединены петлями разной длины, 6 остатков цистеина соединены тремя дисульфидными связями, это даёт столь



**Рис. 1.** Трёхмерные укладки полипептидных цепей ССБ в комплексе со своими мишенями. *a* – Монокло (зелёный) против фторидного канала (серый) 6BQO; *б* – дарпин (серый) против белка MTFP1 (зелёный), 6FP7; *в* – монокло (зелёный) против MLKL (серый), 7JXU; *г* – аффитело ZHER2 (зелёный) против белка HER2 (серый), 3MZW; *д* – кристаллиновый аффилин, 2JDG; *е* – липокалин в комплексе с VEGF, 4QAF; *и* – дарпин (зелёный) против каспазы 7 (серый), 4LSZ; *к* – липокалин (серый) против карбоксиметилкобактина (зелёный), 1X8U; *л* – монокло (зелёный) против фторидного канала (серый), 6B2B

высокую стабильность, что допустимо нагревание в сильноокислой или сильнощелочной среде. *Авимеры* доказывают, что устойчивые минипротеины, в отличие от нанопитинов, аффител и др., могут происходить и из белковых доменов человека (LRP, VLDLR и др.) длиной 35 а.о., в которых 12 а.о. консервативны, а также содержится шесть дисульфидов [18]. Из консенсусной последовательности цистатина и стефина происходят *адхирон-аффимеры*: такие ССБ без дисульфидных связей из одной  $\alpha$ -спирали и четырёх  $\beta$ -цепей с двумя переменными петлями показывают замечательную термическую стабильность (точка денатурации  $T_m \approx 101^\circ\text{C}$ ) [19, 20] и, помимо прочих применений, рассматриваются как аффинный инструмент для диагностики уровня карциноэмбрионального антигена [21]. Домен Кунитца содержит примерно 60 а.о. с тремя дисульфидными связями и тремя петлями, пригодными для варьирования, его использование подкреплено давним успехом — опытом клинического применения калбитора (Kalbitor),

ингибитора калликреина. Среди недавних разработок с применением этого домена нужно отметить *гастротело* из соевого ингибитора трипсина, выдерживающее pH 2 [22], и его гомолог из подсолнечника [23]. Разнообразие ингибиторов протеаз с доменом Кунитца среди белков человека довольно велико; например, неплохой платформой может быть такой домен из предшественника амилоида (APP1), три мутации в котором достаточны для того, чтобы он превосходно ингибировал мезотрипсин ( $K_i \approx 89$  пМ) [24], и — аналогично — устойчивый к протеолизу ингибитор родственной калликреину пептидазы 6 (KLK6), обладающий  $K_i \approx 160$  пМ и временем жизни в организме около 10 дней [25]. Потенциал некоторых разработок пока не вполне понятен, например, это можно сказать о SPINK2 [26] и белках из ядов змей [27].

Антитела неиммуноглобулиновой природы из бесчелюстных могут служить основой для модульного скаффолда для так называемых *репетел* (repebodies) [28], демонстрирующих

высокий уровень экспрессии в бактериях, термодинамическую стабильность, в том числе при изменениях pH, способность ингибировать мишень типа VEGFR *in vivo* [29].

SH2/SH3-Домены среди белков человека представлены более чем сотней нерецепторных тирозинкиназ семейства Src, важного для регуляции клеточного цикла, и другими ферментами. Около ста а.о. организованы как глобула с центральным  $\beta$ -листом, окружённым двумя  $\alpha$ -спиралями, причём две петли можно рандомизировать. Наиболее известными представителями этого скаффолда являются *финомеры* (fynomers), происходящие из тирозинкиназы Fyn [30] и обладающие способностью к отличной бактериальной экспрессии в виде растворимых мономеров без значимой агрегации и с хорошей стабильностью ( $T_m \sim 70^\circ\text{C}$ ) при отсутствии остатков цистеина; а их высокая консервативность позволяет надеяться на низкую иммуногенность [31].

С точки зрения стабильности несомненный интерес представляют белки и пептиды из гипертермофильных и гиперацидофильных микроорганизмов. Существенное развитие получили исследования представителей так называемого ОВ-домена, включающих ДНК-связывающие полипептиды Sac7d и Sso7d архей родов *Sulfolobus*, *Acidanus*, *Pyrobaculum* и т.д. под названиями *нанофитины* и *аффитины*. В структурном смысле они представляют из себя короткий цилиндр из пяти  $\beta$ -цепей, кепированный  $\alpha$ -спиралью; они примечательны хорошей экспрессией растворимого белка в *E. coli* и высокой стабильностью (до  $74^\circ\text{C}$  в диапазоне pH 0–12) [32–35].

Очевидно, что примечательный своей растворимостью внутриклеточный белок глутатионтрансфераза может использоваться для создания универсального скаффолда (*глутело*) [36], однако применение глутел не получило значимого развития.

Термин *аффилины* несколько неудачен, поскольку по происхождению они могут различаться (из димеризованного убиквитина или из  $\gamma$ B-кристаллина с массой около 20 кДа). Можно сказать, что аффилины демонстрируют наиболее яркий пример сложностей, возникающих при попытках внедрения белков, которые сами по себе обладают прекрасными свойствами, в качестве скаффолдов для ССБ. В самом деле, аффилины высокорастворимы и очень стабильны (в 8 М мочеvine, до  $75^\circ\text{C}$ , в интервале pH 1–9) благодаря компактной укладке (так, убиквитин — 76 а.о. длиной — имеет 3,5  $\alpha$ -спирали и пять  $\beta$ -цепей). Однако только 6 а.о. (из цепей, экспонированных на-

ружу со стороны  $\beta$ -структуры и образующих связывающий регион) можно использовать для рандомизации, а внедрение переменных петель существенно обесценивает вышеуказанные достоинства и требует дополнительных усилий для снижения жёсткости вторичной структуры [37].

Поиск новых интересных скаффолдов среди белков человека не прекращается. Например, использование тщательно продуманных критериев систематического скрининга из базы данных трехмёрных структур (молекулярная масса в диапазоне 10–25 кДа, мономерность, наличие структуры с достаточно высоким разрешением ( $< 3,0 \text{ \AA}$ ), продукция в *E. coli*) с последующим ручным отбором по дополнительным критериям (отличие от ранее опубликованных белковых скаффолдов, малое количество остатков цистеина и дисульфидных связей, отсутствие данных о высокой токсичности и/или иммуногенности, отсутствие лигандов или кофакторов, высокая растворимость, лёгкость очистки) дало новый скаффолд, названный ProBi (Protein Binder). Он содержит два поверхностно-экспонированных участка, пригодных для рандомизации, что было показано путём успешной селекции вариантов, связывающихся с человеческим интерлейкином-10 [38]. С учётом большого количества предсказанных структур подходы такого рода станут ещё более плодотворными.

Дальнейшее развитие методов **дизайна *de novo*** неизбежно будет всё более продуктивным. Например, было показано, что даже на основе такого простого модуля, как элемент типа петля-спираль-петля (LUCS), можно генерировать целые семейства белков с настраиваемой геометрией, включающие в себя как природные, так и ранее неизвестные искусственные последовательности [39]. Хорошим примером является *альфатело*: этот скаффолд с молекулярной массой около 10 кДа, гомологов которого в природе нет, сконструирован по принципу тройной спирали с G-богатыми линкерами [40].

## МОНОТЕЛА-АДНЕКТИНЫ И ДРУГИЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ФИБРОНЕКТИНОВОГО ДОМЕНА

Первые ключевые работы по монотелам-аднектинам были опубликованы в 2008 [41], 2011 [42] и 2013 г. [43], а надежды на монотела как лекарственные средства в онкологии впервые вдумчиво обсуждались в 2012 г. в обзоре

Weidle et al. [1]. Постепенное улучшение понимания проблем их практического использования [44, 45] способствовало тому, что в настоящее время не менее двух монотел проходит клинические испытания [7].

По своему происхождению монотела представляют собой десятый домен фибронектина 3 (FBN3), обозначаемый поэтому кратко как 10Fn3. Изначально сравнивалось несколько разных доменов, и любой из них может использоваться (например, *пронектины* происходят из 14 домена фибронектина 3). Однако домен 10 выбран благодаря тому, что он является наиболее стабильным среди повторяющихся доменов FN3 человека, со средней  $T_m = 84^\circ\text{C}$  [41], и толерантен к ряду мутаций в трёх поверхностно-экспонированных петлях. Итак, монотело — это простая структура типа небольшого  $\beta$ -сэндвича из семи  $\beta$ -цепей; такой скаффолд выдерживает рандомизацию и удлинение двух или трёх поверхностных петель, а температура его плавления составляет около  $80^\circ\text{C}$ , несмотря на отсутствие дисульфидных связей [46]. Поскольку остатки цистеина отсутствуют, стабильность монотела слабо зависит от окислительно-восстановительного потенциала, что позволяет избежать дисульфид-опосредованной агрегации. Традиционная для фибронектина мишень — интегрины, причём взаимодействие FN3 со своей мишенью характеризуется гибкостью петель и динамичностью  $\beta$ -листа для обеспечения оптимальной конформации связывания с целевым белком, в отличие от антител, которые проявляют жёсткость в своих  $\beta$ -листах из-за внутренних дисульфидных связей между тяжёлыми и лёгкими цепями [30, 31]. Достоинства монотел обуславливают их применение для ряда научных целей, например, Kükenshöner et al. сообщили об использовании монотел в качестве блокаторов белков, участников модуляции аллостерических сайтов и кристаллических шаперонов [47]. Внутриклеточная стабильность монотел также использовалась для изучения структуры и функции белков внутри клеток, где слитые с флуоресцентным белком монотела — здесь под названием *интратела* против эндогенных нейронных белков — позволили визуализировать возбуждающие и тормозные синапсы в живых нейронах [48].

Высокую стабильность монотел удалось повысить и более, создав ультрастабильный скаффолд FN3con [49], также полученный с помощью консенсусного дизайна (использованием выравнивания 2123 последовательностей), он пригоден даже для графтинга петель из других монотел [50, 51]. Но надо заметить,

что высокая стабильность может быть не всегда желательна при терапевтических применениях.

## ЛИПОКАЛИНЫ-АНТИКАЛИНЫ

С эстетической точки зрения это, вероятно, самый привлекательный скаффолд, поскольку он образует элегантную чашу (*calyx* — то есть имеет форму чашечки цветка) [52, 53], где имеется центральный восьмипочечный антипараллельный  $\beta$ -цилиндр и боковая  $\alpha$ -спираль. На открытом конце  $\beta$ -бочонка четыре структурно изменчивые петли соединяют  $\beta$ -цепи попарно и вместе формируют лигандный карман, то есть имеется четыре петли, пригодные для вариации. Как правило, антикалин имеет около 188 а.о. (и благодаря гликозилированию его молекулярная масса составляет около 21–24 кДа), изоэлектрическую точку около 7,1. Таким образом, библиотеки липокалинов/антикалинов имеют четыре структурно гипервариабельные петли на ободе высококонсервативного  $\beta$ -бочонка. Несмотря на то, что липокалин/антикалин не является коротким пептидом, он оказался подходящим для фагового дисплея. Более того, липокалины хорошо продуцируются в виде мономеров с удовлетворительной растворимостью в бактериях [54]. Используя направленный случайный мутагенез в сочетании с методами молекулярной селекции, можно изменять области петель, создавая карманы для плотного связывания различных лигандов — от малых молекул и пептидов до белков. Происхождение этого скаффолда также чрезвычайно привлекательно, поскольку в данном случае используется нормальный человеческий белок, который секретируется и обладает высокой растворимостью: липокалин-2 (синонимы: LCN2, NGAL, онкоген 24p3, сидерокалин, секретируемый нейтрофилами) способен активно связывать железо (с катехолатом), предотвращая рост бактерий. Его гомологом является преальбумин слёзной жидкости, который также является антибактериальным агентом благодаря секвестрации железа. К сожалению, это же свойство используется некоторыми опухолями, например, в процессе метастазирования в спинномозговую жидкость [55], при раке молочной железы [56] (более подробно рассмотрено в работах Chakraborty et al. и Crescenzi et al. [57, 58]). Однако, с другой стороны, экспрессия липокалина-2 в качестве трансгена может значительно усилить действие онколитических аденовирусов в некоторых моделях

опухолей, таких как аденокарцинома поджелудочной железы и клеточные линии колоректального рака [59, 60], также его экспрессия снижена в клетках рака желудка [61]. Поэтому практическое терапевтическое применение липокалинов будет находиться под пристальным вниманием, поскольку циркулирующие липокаины не только играют противоречивую роль в развитии рака, но и коррелируют с когнитивным расстройством у некоторых пациентов [62].

## ДАРПИНЫ

Дарпины напоминают элегантную гребёнку и являются примером чрезвычайно удачного искусственного скаффолда на основе анкириновых повторов, что демонстрирует успех консенсусного подхода (использование консенсусов из множественных выравниваний гомологичных участков) в дизайне белков (к сожалению, этот простой подход редко даёт плоды). Среди белков человека этот повтор распространён среди адапторных внутриклеточных белков и содержит около 33 а.о. из двух  $\alpha$ -спиралей и одной  $\beta$ -цепи с гидрофильными боковыми экспонированными остатками и гидрофобным внутренним карманом. Типичный дарпин содержит два или четыре повтора, фланкированных двумя кепирующими повторами, тем самым давая массу около 14–21 кДа (температура денатурации поэтому варьирует в широком диапазоне — от 60 до 95 °C). Надо обратить внимание, что в сравнении с большинством упоминаемых здесь ССБ дарпины имеют гораздо большую поверхность для связывания, а рандомизации возможно подвергнуть довольно значительный ряд экспонированных остатков. В настоящее время как минимум два дарпина проходят клинические испытания [7].

## АФФИТЕЛА

Для тех применений ССБ, в которых критично важна как можно меньшая молекулярная масса, зачастую лучшим выбором среди других скаффолдов на сегодняшний день являются *аффитела*, происходящие из домена В IgG-связывающего участка протеина А *S. aureus*. При их дизайне небольшого числа мутаций оказалось достаточно для увеличения стабильности и потери способности связывать антитела. Три  $\alpha$ -спирали, не имеющие остатков цистеина, находятся в единой связке, давая скаффолд массой около 6 кДа, в котором мож-

но рандомизировать экспонированные остатки  $\alpha$ -спиралей 1 и 2.

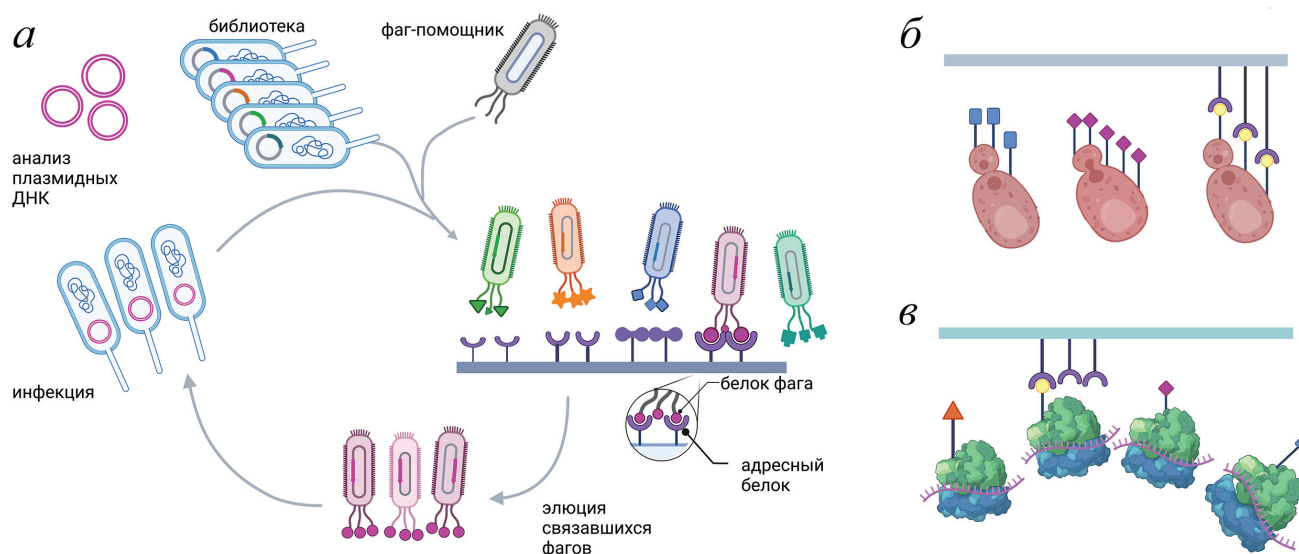
В настоящее время удалось разработать аффитела против многих опухоль-ассоциированных мишеней, причём именно малый размер чрезвычайно выигрышен в диагностике, проводимой при помощи радиоизотопно-меченных аффител. Однако важно понимать, что как только аффитело используется в качестве партнёра для слияния с другим белком (например, токсином), важнейшее преимущество малого размера становится менее существенным по сравнению с любым другим скаффолдом. То же самое верно и при создании биспецифичных антител [63].

## ПРИНЦИПЫ СОЗДАНИЯ И СКРИНИНГА БОЛЬШИХ БИБЛИОТЕК СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Основные методы скрининга библиотек ССБ можно разделить на клеточный дисплей (прежде всего дрожжевой), вирусный (чаще всего фаговый, на поверхности белка рVIII нитевидного бактериофага fd/M13), а также мРНК-дисплей (улучшенный вариант рибосомного дисплея), полностью происходящий *in vitro*. Хотя фаговый дисплей неплохо работает для монотел [41, 64], а также пригоден для многих других ССБ, включая репетела [29], очевидно, что несовершенство реальных фаговых библиотек в настоящее время значительно. Можно рекомендовать отличный обзор по применению фагового дисплея для этих целей [65]. Основной принцип работы с такими библиотеками ССБ изображён на рис. 2.

**Проблемы продукции синтетических связывающих белков.** Нередко от довольно интересных проектов с рекомбинантными белками приходится отказываться из-за их плохой стабильности и, соответственно, низкой экспрессии, чего почти лишены антитела.

Монотела часто весьма успешно продуцируются в *E. coli*. В качестве примера приведём здесь монотела, для которых авторы используют термин *интратела* [66, 67], отметим также свежую работу Olson et al. [68]. Но наш опыт указывает на то, что многие монотела продуцируются в *E. coli* с очень низким выходом (неопубликованные данные), причём особенно ничтожные выходы в данных условиях могут давать монотела с высокой изоэлектрической точкой [69]. Любопытно также, что при анализе ряда случайных клонов отмечен следующий факт: хотя обычно монотела продуцируются



**Рис. 2.** Отбор синтетических связывающих белков при помощи клеточного, фагового или мРНК-дисплея. Системы экспрессии ССБ на поверхности вируса (*а*, чаще всего бактериофага), клетки (*б*, чаще всего дрожжей), или в виде синтезированных, но не диссоциированных от рибосом (*в*, благодаря пурамициновому линкеру) полипептидных цепей, позволяют проводить скрининг библиотек ССБ достаточно быстро и эффективно, например, с использованием мишеней, иммобилизованных на твёрдой фазе. Обычно требуется около трёх раундов отбора и амплификации библиотек до анализа индивидуальных клонов. Использован ресурс biorender.com

на уровне от удовлетворительного до хорошего (4–20 мг/л культуры), их стабильность и растворимость не коррелирует с общим уровнем экспрессии [68], т.е. существенная часть клонов даёт значительное количество агрегированного белка.

Поскольку эффективность моноклональных антител и других неиммуноглобулиновых скаффолдов зачастую уступает антителам, то, в частности, возникают идеи улучшения моноклональных антител при помощи кросс-сшивок, включая дисульфиды [70].

Не каждый скаффолд выдерживает мутации варибельной части, это часто приводит к дестабилизации всей белковой структуры, а неуниверсальность гетерологической экспрессии указывает на сильную ограниченность потенциала самого этого скаффолда в целом. С другой стороны, есть и свежие примеры частичных успехов, например, авимерный А-домен из 35 а.о. с 12 консервативными а.о. и шестью дисульфидами, несмотря на столь малый размер, продуцируется в *E. coli*, а нужные S-S связи образуются на воздухе, что даёт продукт размером около 4 кДа с отличной стабильностью при высокой температуре.

Возможно сильно изменить специфичность высокоаффинного природного связывающего белка, что ярко демонстрирует пример авидина, превращённого в стероид-связывающий белок [71], и дальнейшее развитие так называемых *антидинов* [72].

Очевидным, универсальным, но далеко не всегда успешным подходом следует счи-

тать графтинг. Есть много успешных примеров возможности использовать связывающие петли хороших антител для пересадки в почти любой белок, например, в зелёный флуоресцентный белок, с образованием нового аффинного инструмента, способного к связыванию мишени [73, 74]. Эти подходы предсказуемо выливаются в новые интересные, но не терапевтические направления, используемые, например, для создания флуоресцентных сенсоров важных для онкогенеза белков, таких как MDM2 [75]. Замечательно, что графтинг нередко позволяет купировать проблемы снижения стабильности после отбора: например, направленная эволюция для связывания с терапевтической мишенью VEGFR2 привела к потерям в термостабильности и неконтролируемой олигомеризации, а пересадка петель в скаффолд моноклонального антитела FN3Con с особо высокой стабильностью (конструкция FN3Con-анти-VEGFR2) способна сохранять активность после 2 лет хранения при 36 °C [51].

**Проблемы фармакодинамики и фармакокинетики синтетических связывающих белков.** Надо отметить, что все описанные здесь малые ССБ легко выводятся через почки, поэтому для увеличения времени циркуляции используют стандартные подходы увеличения общей молекулярной массы типа ПЭГилирования, а также введение альбумин-связывающего домена [76]. Хорошо известна и проблема, типичная для большинства биопрепаратов — избыточное накопление в печени. А вот самое

важное — накопление в опухоли и удержание адресных терапевтических препаратов в ней — зависит от сложного взаимодействия таких факторов, как сродство к мишени, молекулярная масса, период полураспада, склонность к экстравазации и другие, причём и дарпины зачастую оказываются слишком велики по размеру и плохо проникают даже вглубь сфероидов в культуре [77].

С другой стороны, важно, что для диагностики полезны метки с более быстрым выведением из нецелевых тканей. Такие метки позволили бы более корректно оценивать сигналы из органов и тканей, что было бы более удобно для пациентов и позволило бы ускорить начало противоопухолевой терапии. Для этого важно использовать небольшие белки, которые могут быть визуализированы в тканях-мишенях в течение 4 ч после введения.

### НОВЫЕ ПОДХОДЫ К УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЙ В ОНКОЛОГИИ

**Конъюгирование и химеризация.** ССБ на основе альтернативных скаффолдов являются чрезвычайно привлекательными модулями для создания поливалентных аффинных инструментов (обзор Sachdev et al. [78]) — существует несколько примеров удачной конъюгации ССБ с низкомолекулярными препаратами, токсинами. Для конъюгатов ССБ с липосомами и наночастицами можно рекомендовать отличный обзор Шипуновой и Деева [79], в качестве примера особо отметив работу, в которой показано, что однослойные липосомы (диаметром 80–90 нм), содержащие цитохром *c*, флуоресцентный mCherry и высокотоксичный экзотоксин А синегнойной палочки с дарпином против HER2, специфически окрашивают и уничтожают HER2<sup>+</sup> клетки [80]. Но, несмотря на успех трастузумаба при раке молочной железы, специфические антитела, как правило, не оказывают влияния на солидные опухоли, поэтому столь важны разработки конъюгатов типа белок-лекарственное средство. Это важно в случае цитотоксических препаратов, которые могут денатурировать белковые структуры, поскольку для устойчивости к агрегации малые белки нуждаются в контролируемой конъюгации. Эта важная особенность имеет решающее значение, поскольку большинство цитотоксических препаратов гидрофобны и могут вызывать неконтролируемую агрегацию антител и других белков для конъюгации.

руемую агрегацию антител и других белков для конъюгации.

Аффитоксин (успешно продуцируется в *E. coli*), состоящий из укороченного дифтерийного токсина и аффитела против HER3 [81] и соединённый также с цитотоксическим ингибитором полимеризации тубулина DM1, проявлял сильное цитотоксическое действие на клетки карциномы поджелудочной железы VxPC-3 ( $IC_{50} = 7$  нМ) [76]. Как большое достоинство, выше упоминалось отсутствие остатков цистеина в его монотелах, но это также позволяет вставить один уникальный совместимый с конъюгацией остаток цистеина для нагрузки низкомолекулярными лекарствами [82].

Очень ценна работа, в которой было проведено сравнение разных видов дарпина против EGFR: моно- и двухвалентный дарпин, конъюгат с Fc, с антителом и с монометилауристатином E в качестве токсина. Такие конъюгаты обладают субнаномолярной цитотоксичностью в отношении клеток A431 (плоскоклеточная карцинома лёгких человека) [83].

**Внеклеточная доставка синтетических связывающих белков для диагностики, тераностики и терапии онкологических заболеваний.** В борьбе с опухолевыми клетками на первое место встаёт связывание ССБ с поверхностными маркерами для диагностики опухолевого роста, классической терапии и тераностики. Радиоизотопный имиджинг хорошо освещён в специальных обзорах антител и скаффолдов неиммуноглобулиновой природы [84, 85], с более широким охватом специфических молекулярных инструментов — в работах Klont et al. и Mayoral-Peña et al. [86, 87], с прицелом на теранотику опухолей — в работах Шипуновой и соавт., Шиловой и соавт. [79, 88]. Особо отметим ценную и очень редкую сравнительную работу, в которой для магнитных флуоресцентных наночастиц, направленных против HER2, сравнены между собой полно-размерные IgG, дарпин и аффитело. Оказалось, что аффитело наиболее эффективно с точки зрения специфичности и селективности при мечении раковых клеток с помощью наночастиц [89].

**VEGF и VEGFR2.** Среди основных молекулярных мишеней, используемых в настоящее время для разработки диагностических и терапевтических средств, прежде всего следует упомянуть антиангиогенные средства, например, репетело, нацеленное на VEGF [29] (хотя, строго говоря, VEGF, будучи секретлируемым белком, не является сам по себе опухолевым маркером). Рецептор VEGF служит ещё более

хорошей мишенью, например, монотело СТ-322 против **VEGFR2** [90] успешно прошло первую фазу клинических испытаний у пациентов с раком поджелудочной железы [51].

**HER2** — архетипичный маркер для значительного количества раков молочной железы, который благодаря успеху трастузумаба привлекает повышенное внимание для разработки аналогов на основе ССБ (часть работ упомянута выше). Например, применяются токсичные дарпины против HER2, конъюгированные с золотыми мини-наностержнями; такой конъюгат избирательно накапливается в HER2<sup>+</sup> ксенотрансплантатных опухолях у мышей, что способствует сильному уменьшению опухоли после фотодинамической терапии [80]. Молекулы аффитела, меченные <sup>68</sup>Ga, позволяют точно и специфично измерять экспрессию HER2 в метастазах рака молочной железы при ПЭТ-имиджинге [91].

**EGFR.** Практическое терапевтическое применение в тераностике имеют радиомеченные аффитела [92]. Успех такого тераностического подхода подкреплён примером affiFAP, который состоит из аффитела против EGFR и белка, активирующего флуороген. Этот компактный аффинный реагент может активировать флуоресценцию при связывании, позволяя визуализировать опухоль с низким уровнем неспецифического окрашивания тканей [93]. Центирины (происходящие из домена теназина, 10 кДа) и репетела хорошо себя показали в виде конъюгатов с красителем при интраоперационной флуоресцентной диагностике опухолей со сверхэкспрессией EGFR [94]. Также отметим отличную работу Maczyńska et al. по терапевтическим аффителам, где для фотодинамической терапии аффитело против EGFR конъюгировали с IR700. АФК при ИР-облучении способствовали иммуногенной клеточной смерти (ИКС) с последующим созревaniem дендритных клеток, а терапевтический ответ *in vivo* наблюдался в опухолях головного мозга вскоре после облучения [95].

Экспонированный на поверхности **калре-тикулин (экто-CRT)** играет решающую роль в фагоцитарном поглощении апоптотических клеток во время иммунотерапии. Два пептида, KLGFFKR из интегрин-α и GQPMYGQPMY из Her-I, специфически связывают экто-CRT при индукции ИКС. Монотела с графтингом обеих указанных последовательностей показали хорошее связывание с экто-CRT, эффективно обнаруживая преапоптотические клетки при обработке доксорубицином, но не гемцитабином, который не индуцирует ИКС. Более того, используя CRT-специфические моноте-

ла, можно обнаружить индукцию экто-CRT в раковых клетках в ответ на воздействие лекарственных препаратов [66].

Путём скрининга комбинаторных библиотек кноттинов с помощью фагового дисплея обнаружены **EDB**-специфические ССБ, способные в пикомолярном диапазоне окрашивать EDB<sup>+</sup> клетки (то есть содержащие опухоль-специфичный домен фибронектина) в срезах тканей, полученных из ксенотрансплантатов человеческой глиобластомы U-87 MG у мышей [96].

**Синергизм, наблюдаемый при использовании двух и более ССБ** [97], хорошо иллюстрирован примером аффитоксина, состоящего из укороченной формы дифтерийного токсина и HER3-связывающего домена аффитела [81], а также похожим примером с двумя дарпинами [98, 99]. Конъюгаты экзотоксина А синегнойной палочки и барназы с дарпинами были применены в модели мышей с карциномой молочной железы: здесь монотерапия анти-HER2 или анти-ЕрСАМ оказалась неэффективной, в отличие от одновременного действия против HER2 и ЕрСАМ [99]. Похожие примеры сильного усиления действия ССБ на опухолевые клетки можно найти и в других работах [100, 101].

**Онколитические вирусы (ОВ).** Очевидным применением для ССБ может быть нацеливание ОВ. Ясно, что ССБ с гораздо большей лёгкостью, чем антитело, можно ввести в поверхность капсида ОВ. В самом деле, опубликованные результаты оптимистичны, например, получен вакцинный вирус кори MeV, в котором вирусный белок адгезии слит с дарпином против EGFR таким образом, чтобы при связывании происходила активация опухолевыми матриксными металлопротеазами. Такой ОВ с двойной мишенью реплицировался в опухолевых клетках EGFR<sup>+</sup>/MMP<sup>+</sup>, но был безопасен для здоровых клеток (EGFR<sup>+</sup> кератиноциты человека). Такой вирус уничтожал клетки глиобластомы и другие опухолевые клетки [102]. Аналогично были использованы и кноттины, например, СКР (связывающий интегрин αvβ3, αvβ5 и α5β1 с наномолярной аффинностью). В данном случае ОВ, называемый MV-СКРint, инфицировал клетки глиобластомы человека, реплицировался в них и затем убивал эти клетки, а также клетки медулlobластомы, диффузной внутренней глиомы моста и меланомы *in vitro*. При внутривенной доставке такой вирус лучше достигал клеток глиобластомы, вызывая цитопатические эффекты, сходные с таковыми при внутриопухолевой инъекции вируса [103].

Доставку репликативно-дефицитных вирусов типа аденоассоциированных вирусов (ААВ) для векторной генетической терапии рака также можно успешно усилить ССБ, например, путём экспонирования HER2-специфического дарпина на поверхности ААВ [104].

**Клеточная терапия.** Аналогично ССБ могут быть применены и для усиления клеточной противоопухолевой терапии, например, в методе CAR-T [105]. Здесь отдельно надо отметить недавний успех большого коллектива преимущественно российских авторов, улучшивших CAR-T за счёт высокой аффинности пары «бактериальный токсин—антитоксин» барназа—барстар, где для направления CAR-T-клеток к солидным опухолям и для уничтожения карциномы HER2<sup>+</sup> *in vivo* использовали конъюгаты дарпин—барназа [106].

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПРОТИВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ОНКОМИШЕНЕЙ

**Ингибиторы взаимодействий с MDM2.** Продукт гена *Trp53* является одним из важнейших онкосупрессоров человека, подавляющим бесконтрольное деление раковых клеток [107]. В опухолях p53 часто мутирован или разрушается на белковом уровне за счёт действия убиквитинлигазы MDM2, которая, в свою очередь, также подвергается посттрансляционным изменениям [108]. Несмотря на тот факт, что был синтезирован целый ряд низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия между p53 и MDM2 [109, 110], ни одно из клинических испытаний этих ингибиторов не увенчалось успехом. Было также создано достаточно много аффинных инструментов, например, монотела против N-концевого домена MDM2/X и против  $\alpha$ -спирали, присутствующей в N-концевом трансактивационном домене p53 [111], которые показали хорошую активность *in vitro*, но не оправдали надежд на аналогичный эффект в клинических испытаниях.

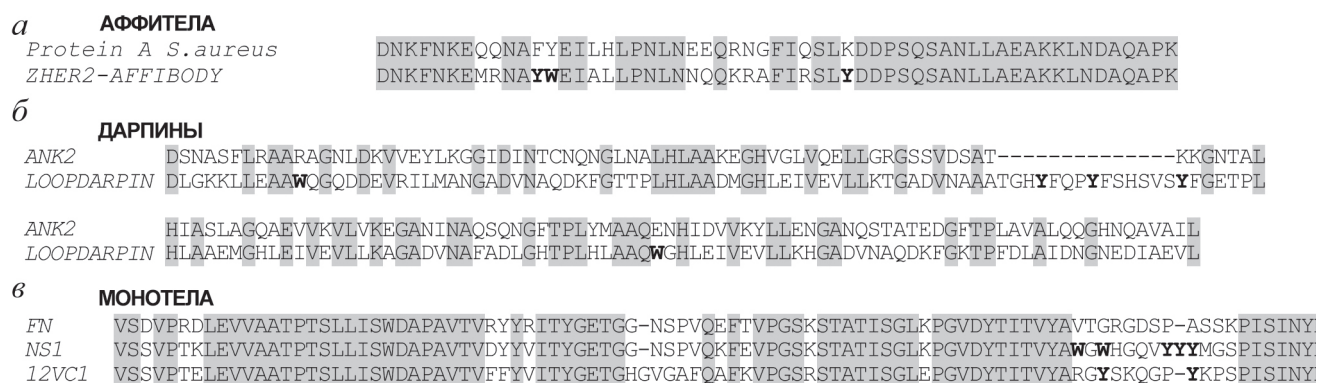
**Атака на KRAS.** GTPазы семейства Ras, в особенности KRAS, часто мутированы во многих раках. В частности, KRAS-клетки протоковой аденокарциномы поджелудочной железы в более чем половине случаев содержат мутации G12D, G12C, G12R или G12V. Эти ферменты содержат карман, который способен связывать GTP и GDP с пикомолярным сродством, запуская внутриклеточные сигнальные пути, которые усиливают пролиферацию клеток. Поскольку GTP и GDP присутствуют в клетке в миллимолярных концентрациях, то любая

конкуренция со стороны экзогенных низкомолекулярных ингибиторов чрезвычайно затруднена. Остальная часть поверхности белка Ras относительно плоская и, следовательно, не имеет карманов, подходящих для высокоаффинного взаимодействия с малыми молекулами.

Было обнаружено, что монотело NS1 аллостерически ингибирует RAS-опосредованную сигнализацию. Удивительно, но NS1 связывается с поверхностью, отличающейся от таковых для других эффекторных молекул, связывающихся с RAS. NS1 делает это таким образом, что взаимодействие между RAS и киназой Raf не нарушается, но ингибирует димеризацию RAS, что далее ингибирует димеризацию уже Raf, что в конечном итоге приводит к ингибированию Ras-опосредованной сигнализации в целом [112]. Монотела против мутанта KRAS G12V впервые описаны под названием «RasIns» (или *интратела*). Эти монотела селективны для активного состояния Ras. В то же время эти фибронеكتины связывают как H-, так и K-Ras-GTP мутанты [67]. В случае этого монотела продукция в *E. coli* была успешной. Недавние успехи в разработке монотел против мутантов KRAS довольно значительны, например, монотело I2VC1 (рис. 3) распознаёт активное состояние KRAS с мутациями G12V и G12C [113]; монотело R15 реагирует со всеми изоформами апо-Ras (то есть в свободной от GTP или GDP конформации), но *in vivo* лучше всего работает против KRAS (G15C) [114]; интересны также перспективы ещё одного пан-Ras монотела JAM20, реагирующего с Ras вне зависимости от их связывания с GTP/GDP [115].

Дарпин K27 связывается преимущественно с неактивной формой Ras-GDP с  $K_d = 4$  нМ. Внутриклеточная экспрессия K27 значительно снижает активность Ras, ингибирует нисходящую сигнализацию, в частности, уровень фосфорилированного ERK, и замедляет рост в мягком агаре клеток HCT116 [116]. Дарпины, которые специфически ингибируют изоформу KRAS путём связывания с аллостерическим сайтом, охватывающим область вокруг специфического для KRAS остатка гистидина-95, специфически ингибируют взаимодействие KRAS/эффектора и зависимые сигнальные пути в раковых клетках [117].

Ras-Связывающие минипротеины связываются с эффекторным доменом Ras в виде димеров, а точечный мутант Ras стабилизируют в открытой конформации, захваченной этими минибелками. Такой минипротеин aPP содержит N-концевую полипролиновую спи-



**Рис. 3.** Аминокислотные последовательности некоторых ССБ, выравненные со своими предшественниками. Серым выделены идентичные а.о. Уникальные остатки тирозина и триптофана в ССБ выделены жирным шрифтом. а – Аффитела: выравнивание последовательности аффитела против HER2 с участком последовательности белка A *S. aureus*; б – дарпины: выравнивание дарпина типа loopdarpin с участком последовательности анкирина человека (ANK2); в – выравнивание монотел (NS1 против Ras и 12VC1 против KRAS с мутацией G12V) с участком последовательности фибронектина человека (FN)

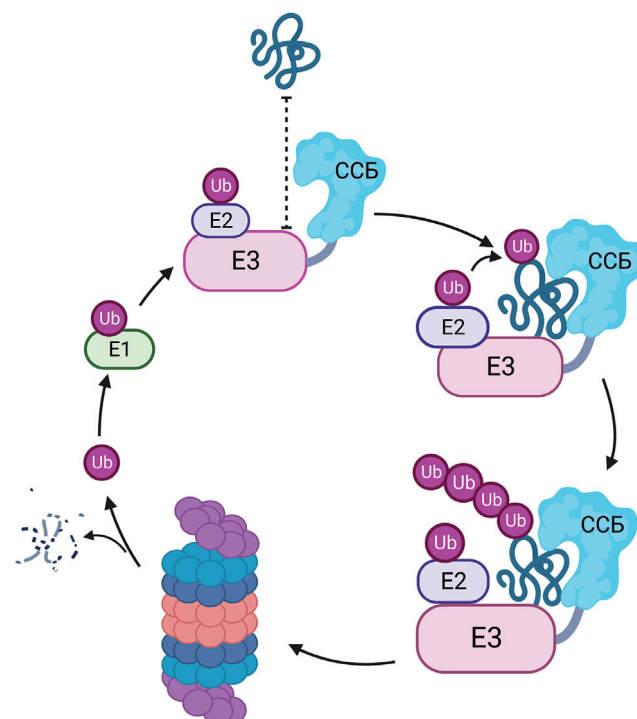
раль типа II, соединённую короткой петлёй с С-концевой  $\alpha$ -спиралью, которую он стабилизирует за счёт гидрофобных взаимодействий. Он успешно экспрессируется в *E. coli* [118].

Созданы также конформационно-селективные ССБ для мутантного KRAS на основе репетела, которые эффективно блокируют взаимодействие между активным KRAS и RAS-связывающим доменом BRAF, подавляя KRAS-опосредованную передачу сигнала [119].

**Идея принудительной деградации внутриклеточных мишеней** связующими элементами оказалась весьма плодотворной. Например, монотела могут быть использованы для деградации белковой мишени путём селективной доставки сигнала деградации к эндогенному белку внутри клетки при конъюгации или слиянии с E3-убиквитинлигазами (схема показана на рис. 4). Наиболее популярными лигазами являются MDM2 или онкопротеин-супрессор VHL (Von-Hippel-Lindau), однако возможности для разработок гораздо шире, поскольку в клетке человека имеется около 600 различных E3-лигаз. Кажется, что среди всех ССБ оптимальным является использование именно слитых с E3-лигазами монотел [120, 121]. Проблема доставки может быть решена многими способами. В качестве примера можно упомянуть химерный бактериальный токсин, состоящий из субъединицы гомолога шигатоксина В (Stx2B) и транслокационного домена экзотоксина А (ETA-II) *P. aeruginosa*, слитого с VHL и монотелом против эндогенных тирозинкиназ [120].

**Синтетические связывающие белки в качестве трансгенов онколитических вирусов.** Экспрессия трансгена липокалина-2 может значительно усилить действие онколитических

аденовирусов в некоторых моделях опухолей, таких как аденокарцинома поджелудочной железы и клеточные линии колоректального рака [59, 60]. Очевидно, что ОБ следует вооружать последовательностями, которые кодируют белки слияния MDM2, VHL или другие убиквитинлигазы с монотелами против мутантов KRAS и других онкомишеней.



**Рис. 4.** Разрушение внутриклеточных мишеней при помощи слитых с E3-убиквитинлигазами ССБ. После связывания ССБ со своей мишенью активность убиквитинлигаз способствует полиубиквитинилированию мишени с последующим разрушением протеасомой. Использован ресурс biorender.com

# **НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**Модульный подход в разработках ССБ** чрезвычайно продуктивен. В случае мини-протеинов возможен твердофазный пептидный синтез, а значит, и чрезвычайно широкий спектр модификаций, включая новые кросс-сшивки, структура которых может играть особую роль. Чрезвычайно успешным примером является димеризация кноттина (33-аминокислотный полипептид из ингибитора трипсина *Ecballium elaterium*, который связывается с интегринами  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$  и  $\alpha 5\beta 1$ ) [122]: его димер помогает увеличить чувствительность клеток рака поджелудочной железы к гемцитабину.

Лигирование белков к настоящему моменту весьма многообразно, и лучше всего обратиться к обзору, в котором обсуждаются достоинства и недостатки различных подходов: взаимодействие докерин-кохезин, система специфической транслугтаминазной реакции SpyTag-SpyCatcher, опосредованное сортировкой лигирование и другие методы [123], образование альдегидных групп на поверхности белка ферментом, генерирующим формилглицин [124]. Но важно заметить, что использование кросс-сшивок следует расширять в связи, например, с открытием существования лизин-цистеиновых мостиков, чувствительных к окислительно-восстановительному потенциалу (мостики NOS и сера-кислород-азот-кислород-сера (SONOS)) [125]

**Каталитические синтетические связывающие белки.** Здесь следует вспомнить каталитические антитела, особенно с протеазной активностью — они могли бы не только связывать, но и разрушать свои мишени вне зависимости от протеасомы. Более того, такие ССБ должны бы быть чрезвычайно сайт-специфичными, индивидуальными и, таким образом, превосходить любые обычные протеазы. До сих пор успехи в разработке протеолитических антител были довольно скромными, поскольку в энзиматическом смысле каталитические антитела демонстрируют хорошую  $K_m$ , но довольно слабую  $V_{max}$ . Однако следует отметить, что эта ситуация может быть улучшена в будущем, и лучшими кандидатами представляются скорее не антитела, а неиммуноглобулиновые ССБ, поскольку некоторые из них не обладают вышеупомянутой жёсткостью скаффолда. Это направление в целом продолжает развиваться и на нанотелах, например,

с использованием L-аспарагиназы — амидогидролазы, которая успешно используется для лечения острого лимфобластного лейкоза уже более 50 лет. В данном случае полная замена скаффолда позволила минимизировать L-аспарагиназу, которая успешно воздействует на клетки, экспрессирующие CD19 [126].

**Неканонические аминокислотные остатки в синтетических связывающих белках.** Совершенно очевидно, что вариабельность связывающих карманов в иммуноглобулинах или альтернативных ССБ находится на грани предела из-за химических ограничений, хотя в модельной системе квазиспецифическое связывание может быть достигнуто и с помощью четвертичного [127, 128] или даже бинарного кода в участках, определяющих комплементарность (complementarity-determining regions, CDR) антител, например, всего с двумя аминокислотными остатками, а именно тирозином и серином типа YXS [129]. Надо отметить высокое содержание тирозина (на рис. 3 это видно для аффитела и монотела, но не дарпина) во многих из этих связывающих последовательностей [127], способствующих высокой аффинности, но разумно предположить, что появление олиготирозиновых участков может снизить специфичность антитела или ССБ к своей мишени. Также замечено, что неспецифические аутореактивные антитела богаты остатками аргинина и лизина [128], а для pH-чувствительных антител характерно обогащение остатками гистидина [130]. Очевидно из общих соображений и показано экспериментально, что 20-аминокислотные библиотеки намного превосходят 4-аминокислотные [131], соответственно, дальнейшее увеличение разнообразия также должно способствовать улучшению свойств ССБ, и можно задаться вопросом о том, как долго следует ограничиваться стандартным генетическим кодом со скудным набором всего лишь из 20 основных аминокислот? Безусловно, следует воспользоваться новыми захватывающими возможностями, которые стали доступны благодаря недавнему прогрессу в рибосомном синтезе белка с неканоническими остатками. Химическая (в том числе катализируемая ферментами) модификация карманов связывания также возможна, но она обычно проблематична с точки зрения желаемого (близкого к 100%) выхода и специфичности. Логично использовать расширенный диапазон химической функциональности — неканонические аминокислоты вблизи CDR, где их встраивание достаточно хорошо переносится: недавно было показано, что существует возможность интеграции дрож-

жевого скрининга и неканонических аминокислот при поиске белков с «химически расширенными» функциями [124].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В макроскопическом мире весьма трудно создать, например, специфические крючки для каждого отдельного вида рыб, варьируя их конструкцию в соответствии с особенностями ротовой полости. Тем более удивительно, насколько грандиозны успехи в создании всевозможных аффинных реагентов как на основе удачных изобретений природы, так и на основе различных подходов, смело предпринятых человеком и открывающих принципиально новые технологии. Также очевидна и важность продолжения изучения таких давно известных белков, как иммуноглобулины. Это наглядно показало недавнее открытие необычной структуры в CDR бычьего иммуноглобулина [132] – грибоподобного удлинения, что может быть полезно и для разработки ССБ на основе неиммуноглобулиновых скаффолдов путём внедрения ультрадлинных петель по аналогии с давней

попыткой разработки так называемых луп-дарпинов [133].

**Вклад авторов.** Н.А. Барлев – концепция обзора и редактирование текста; Т.И. Дэвид, Н.Б. Пестов, Т.В. Корнеев – написание текста и создание иллюстраций.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-305).

**Благодарности.** Авторы благодарны Ю.М. Розенбергу за вдумчивое прочтение черновой рукописи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания проведённых авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer ([www.springer.com/journal/10541](http://www.springer.com/journal/10541)), том 88, вып. 9, 2023.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weidle, U. H., Auer, J., Brinkmann, U., Georges, G., and Tiefenthaler, G. (2013) The emerging role of new protein scaffold-based agents for treatment of cancer, *Cancer Genomics Proteomics*, **10**, 155-168.
- Rabia, L. A., Desai, A. A., Jhaji, H. S., and Tessier, P. M. (2018) Understanding and overcoming trade-offs between antibody affinity, specificity, stability and solubility, *Biochem. Eng. J.*, **137**, 365-374, doi: 10.1016/j.bej.2018.06.003.
- Cunningham, O., Scott, M., Zhou, Z. S., and Finlay, W. J. J. (2021) Polyreactivity and polyspecificity in therapeutic antibody development: risk factors for failure in preclinical and clinical development campaigns, *MAbs*, **13**, 1999195, doi: 10.1080/19420862.2021.1999195.
- Van Regenmortel, M. H. V. (2014) Specificity, polyspecificity, and heterospecificity of antibody-antigen recognition, *J. Mol. Recognit.*, **27**, 627-639, doi: 10.1002/jmr.2394.
- Пестов Н. Б., Гусакова Т. В., Костина М. Б., Шапаронов М. И. (1996) Фаговые мимотопы моноклональных антител к  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азе плазматических мембран, *Биоорг. Хим.*, **22**, 664.
- Rabia, L. A., Zhang, Y., Ludwig, S. D., Julian, M. C., and Tessier, P. M. (2018) Net charge of antibody complementarity-determining regions is a key predictor of specificity, *Protein Eng. Des. Sel.*, **31**, 409-418, doi: 10.1093/protein/gzz002.
- Gebauer, M., and Skerra, A. (2020) Engineered protein scaffolds as next-generation therapeutics, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **60**, 391-415, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021118.
- Aguilar, G., Vigano, M. A., Affolter, M., and Matsuda, S. (2019) Reflections on the use of protein binders to study protein function in developmental biology, *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, **8**, e356, doi: 10.1002/wdev.356.
- Jenkins, T. P., Fryer, T., Dehli, R. I., Jürgensen, J. A., Fuglsang-Madsen, A., et al. (2019) Toxin neutralization using alternative binding proteins, *Toxins (Basel)*, **11**, E53, doi: 10.3390/toxins11010053.
- Olaleye, O., Govorukhina, N., van de Merbel, N. C., and Bischoff, R. (2021) Non-antibody-based binders for the enrichment of proteins for analysis by mass spectrometry, *Biomolecules*, **11**, 1791, doi: 10.3390/biom11121791.
- Bondos, S. E., Dunker, A. K., and Uversky, V. N. (2022) Intrinsically disordered proteins play diverse roles in cell signaling, *Cell Commun. Signal.*, **20**, 20, doi: 10.1186/s12964-022-00821-7.
- Karlsson, O. A., Ramirez, J., Öberg, D., Malmqvist, T., Engström, Å., et al. (2015) Design of a PDZbody, a bi-

- valent binder of the E6 protein from human papilloma-virus, *Sci. Rep.*, **5**, 9382, doi: 10.1038/srep09382.
13. Sha, F., Salzman, G., Gupta, A., and Koide, S. (2017) Monobodies and other synthetic binding proteins for expanding protein science, *Protein Sci.*, **26**, 910-924, doi: 10.1002/pro.3148.
14. Hantschel, O., Biancalana, M., and Koide, S. (2020) Monobodies as enabling tools for structural and mechanistic biology, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **60**, 167-174, doi: 10.1016/j.sbi.2020.01.015.
15. McConnell, S. J., and Hoess, R. H. (1995) Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries, *J. Mol. Biol.*, **250**, 460-470, doi: 10.1006/jmbi.1995.0390.
16. Ciesiołkiewicz, A., Lizandra Perez, J., and Berlicki, Ł. (2022) Miniproteins in medicinal chemistry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **71**, 128806, doi: 10.1016/j.bmcl.2022.128806.
17. Kolmar, H. (2008) Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins, *FEBS J.*, **275**, 2684-2690, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06440.x.
18. Silverman, J., Liu, Q., Bakker, A., To, W., Duguay, A., et al. (2005) Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1556-1561, doi: 10.1038/nbt1166.
19. Tiede, C., Tang, A. A. S., Deacon, S. E., Mandal, U., Nettleship, J. E., et al. (2014) Adhiron: a stable and versatile peptide display scaffold for molecular recognition applications, *Protein Eng. Des. Sel.*, **27**, 145-155, doi: 10.1093/protein/gzu007.
20. Tiede, C., Bedford, R., Heseltine, S. J., Smith, G., Wijetunga, I., et al. (2017) Affimer proteins are versatile and renewable affinity reagents, *Elife*, **6**, e24903, doi: 10.7554/eLife.24903.
21. Shamsuddin, S. H., Jayne, D. G., Tomlinson, D. C., McPherson, M. J., and Millner, P. A. (2021) Selection and characterisation of Affimers specific for CEA recognition, *Sci. Rep.*, **11**, 744, doi: 10.1038/s41598-020-80354-6.
22. Wicke, N., Bedford, M. R., and Howarth, M. (2021) Gastrobodies are engineered antibody mimetics resilient to pepsin and hydrochloric acid, *Commun. Biol.*, **4**, 960, doi: 10.1038/s42003-021-02487-2.
23. Zoller, F., Markert, A., Barthe, P., Zhao, W., Weichert, W., et al. (2012) Combination of phage display and molecular grafting generates highly specific tumor-targeting miniproteins, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 13136-13139, doi: 10.1002/anie.201203857.
24. Cohen, I., Kayode, O., Hockla, A., Sankaran, B., Radisky, D. C., et al. (2016) Combinatorial protein engineering of proteolytically resistant mesotrypsin inhibitors as candidates for cancer therapy, *Biochem. J.*, **473**, 1329-1341, doi: 10.1042/BJ20151410.
25. Sananes, A., Cohen, I., Shahar, A., Hockla, A., De Vita, E., et al. (2018) A potent, proteolysis-resistant inhibitor of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) for cancer therapy, developed by combinatorial engineering, *J. Biol. Chem.*, **293**, 12663-12680, doi: 10.1074/jbc.RA117.000871.
26. Nishimiya, D., Kawaguchi, Y., Kodama, S., Nasu, H., Yano, H., et al. (2019) A protein scaffold, engineered SPINK2, for generation of inhibitors with high affinity and specificity against target proteases, *Sci. Rep.*, **9**, 11436, doi: 10.1038/s41598-019-47615-5.
27. Jia, Z., Liu, Y., Ji, X., Zheng, Y., Li, Z., et al. (2021) DAKS1, a Kunitz scaffold peptide from the venom gland of *Deinagkistrodon acutus* prevents carotid-artery and middle-cerebral-artery thrombosis via targeting factor Xia, *Pharmaceuticals (Basel)*, **14**, 966, doi: 10.3390/ph14100966.
28. Lee, S.-C., Park, K., Han, J., Lee, J., Kim, H. J., et al. (2012) Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 3299-3304, doi: 10.1073/pnas.1113193109.
29. Hwang, D.-E., Ryou, J.-H., Oh, J. R., Han, J. W., Park, T. K., and Kim, H.-S. (2016) Anti-human VEGF repebody effectively suppresses choroidal neovascularization and vascular leakage, *PLoS One*, **11**, e0152522, doi: 10.1371/journal.pone.0152522.
30. Liu, H., Huang, H., Voss, C., Kaneko, T., Qin, W. T., et al. (2019) Surface loops in a single SH2 domain are capable of encoding the spectrum of specificity of the SH2 family, *Mol. Cell. Proteomics*, **18**, 372-382, doi: 10.1074/mcp.RA118.001123.
31. Schlatter, D., Brack, S., Banner, D. W., Batey, S., Benz, J., et al. (2012) Generation, characterization and structural data of chymase binding proteins based on the human Fyn kinase SH3 domain, *MAbs*, **4**, 497-508, doi: 10.4161/mabs.20452.
32. Garlich, J., Cinier, M., Chevrel, A., Perrocheau, A., Eyerman, D. J., et al. (2022) Discovery of APL-1030, a novel, high-affinity nanofitin inhibitor of C3-mediated complement activation, *Biomolecules*, **12**, 432, doi: 10.3390/biom12030432.
33. Gocha, T., Rao, B. M., and DasGupta, R. (2017) Identification and characterization of a novel Sso7d scaffold-based binder against Notch1, *Sci. Rep.*, **7**, 12021, doi: 10.1038/s41598-017-12246-1.
34. Kalichuk, V., Renodon-Cornière, A., Béhar, G., Carrión, F., Obal, G., Maillason, M., et al. (2018) A novel, smaller scaffold for Affitins: showcase with binders specific for EpCAM, *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 290-299, doi: 10.1002/bit.26463.
35. Steemson, J. D., Baake, M., Rakonjac, J., Arcus, V. L., and Liddament, M. T. (2014) Tracking molecular recognition at the atomic level with a new protein scaffold based on the OB-fold, *PLoS One*, **9**, e86050, doi: 10.1371/journal.pone.0086050.
36. Napolitano, E. W., Villar, H. O., Kauvar, L. M., Higgins, D. L., Roberts, D., et al. (1996) Glubodies: randomized libraries of glutathione transferase

- enzymes, *Chem. Biol.*, **3**, 359-367, doi: 10.1016/s1074-5521(96)90119-2.
37. Lorey, S., Fiedler, E., Kunert, A., Nerkamp, J., Lange, C., et al. (2014) Novel ubiquitin-derived high affinity binding proteins with tumor targeting properties, *J. Biol. Chem.*, **289**, 8493-8507, doi: 10.1074/jbc.M113.519884.
  38. Pham, P. N., Huličiak, M., Biedermannová, L., Černý, J., Charnavets, T., et al. (2021) Protein Binder (ProBi) as a new class of structurally robust non-antibody protein scaffold for directed evolution, *Viruses*, **13**, 190, doi: 10.3390/v13020190.
  39. Pan, X., Thompson, M. C., Zhang, Y., Liu, L., Fraser, J. S., et al. (2020) Expanding the space of protein geometries by computational design of *de novo* fold families, *Science*, **369**, 1132-1136, doi: 10.1126/science.abc0881.
  40. Desmet, J., Verstraete, K., Bloch, Y., Lorent, E., Wen, Y., et al. (2014) Structural basis of IL-23 antagonism by an Alphabody protein scaffold, *Nat. Commun.*, **5**, 5237, doi: 10.1038/ncomms6237.
  41. Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X., and Koide, S. (1998) The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins, *J. Mol. Biol.*, **284**, 1141-1151, doi: 10.1006/jmbi.1998.2238.
  42. Lipovsek, D. (2011) Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics, *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 3-9, doi: 10.1093/protein/gzq097.
  43. Sullivan, M. A., Brooks, L. R., Weidenborner, P., Domm, W., Mattiaccio, J., et al. (2013) Anti-idiotypic monobodies derived from a fibronectin scaffold, *Biochemistry*, **52**, 1802-1813, doi: 10.1021/bi3016668.
  44. Chandler, P. G., and Buckle, A. M. (2020) Development and differentiation in monobodies based on the fibronectin type 3 domain, *Cells*, **9**, E610, doi: 10.3390/cells9030610.
  45. Akkapeddi, P., Teng, K. W., and Koide, S. (2021) Monobodies as tool biologics for accelerating target validation and druggable site discovery, *RSC Med. Chem.*, **12**, 1839-1853, doi: 10.1039/d1md00188d.
  46. Batori, V., Koide, A., and Koide, S. (2002) Exploring the potential of the monobody scaffold: effects of loop elongation on the stability of a fibronectin type III domain, *Protein Eng.*, **15**, 1015-1020, doi: 10.1093/protein/15.12.1015.
  47. Kükenshöner, T., Schmit, N. E., Bouda, E., Sha, F., Pojer, F., et al. (2017) Selective targeting of SH2 domain-phosphotyrosine interactions of Src family tyrosine kinases with monobodies, *J. Mol. Biol.*, **429**, 1364-1380, doi: 10.1016/j.jmb.2017.03.023.
  48. Gross, G. G., Junge, J. A., Mora, R. J., Kwon, H.-B., Olson, C. A., et al. (2013) Recombinant probes for visualizing endogenous synaptic proteins in living neurons, *Neuron*, **78**, 971-985, doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.017.
  49. Porebski, B. T., Conroy, P. J., Drinkwater, N., Schofield, P., Vazquez-Lombardi, R., et al. (2016) Circumventing the stability-function trade-off in an engineered FN3 domain, *Protein Eng. Des. Sel.*, **29**, 541-550, doi: 10.1093/protein/gzw046.
  50. Porebski, B. T., Nickson, A. A., Hoke, D. E., Hunter, M. R., Zhu, L., et al. (2015) Structural and dynamic properties that govern the stability of an engineered fibronectin type III domain, *Protein Eng. Des. Sel.*, **28**, 67-78, doi: 10.1093/protein/gzv002.
  51. Chandler, P. G., Tan, L. L., Porebski, B. T., Green, J. S., Riley, B. T., et al. (2021) Mutational and biophysical robustness in a prestabilized monobody, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100447, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100447.
  52. Deuschle, F.-C., Ilyukhina, E., and Skerra, A. (2021) Anticalin® proteins: from bench to bedside, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **21**, 509-518, doi: 10.1080/14712598.2021.1839046.
  53. Achatz, S., Jarasch, A., and Skerra, A. (2022) Structural plasticity in the loop region of engineered lipocalins with novel ligand specificities, so-called Anticalins, *J. Struct. Biol.*, **6**, 100054, doi: 10.1016/j.jysbx.2021.100054.
  54. Gebauer, M., Schiefner, A., Matschiner, G., and Skerra, A. (2013) Combinatorial design of an anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin, *J. Mol. Biol.*, **425**, 780-802, doi: 10.1016/j.jmb.2012.12.004.
  55. Chi, Y., Remsik, J., Kiseliovas, V., Derderian, C., Sener, U., et al. (2020) Cancer cells deploy lipocalin-2 to collect limiting iron in leptomeningeal metastasis, *Science*, **369**, 276-282, doi: 10.1126/science.aaz2193.
  56. Yang, J., Bielenberg, D. R., Rodig, S. J., Doiron, R., Clifton, M. C., et al. (2009) Lipocalin 2 promotes breast cancer progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3913-3918, doi: 10.1073/pnas.0810617106.
  57. Chakraborty, S., Kaur, S., Guha, S., and Batra, S. K. (2012) The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1826**, 129-169, doi: 10.1016/j.bbcan.2012.03.008.
  58. Crescenzi, E., Leonardi, A., and Pacifico, F. (2021) NGAL as a potential target in tumor microenvironment, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12333, doi: 10.3390/ijms222212333.
  59. Xu, B., Zheng, W., Jin, D., Wang, D., Liu, X., and Qin, X. (2012) Treatment of pancreatic cancer using an oncolytic virus harboring the lipocalin-2 gene, *Cancer*, **118**, 5217-5226, doi: 10.1002/cncr.27535.
  60. Xu, B., Zheng, W.-Y., Feng, J.-F., Huang, X.-Y., and Ge, H. (2013) One potential oncolytic adenovirus expressing Lipocalin-2 for colorectal cancer therapy, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **28**, 415-422, doi: 10.1089/cbr.2012.1352.
  61. Nishimura, S., Yamamoto, Y., Sugimoto, A., Kushiya, S., Togano, S., et al. (2022) Lipocalin-2 negatively regulates epithelial-mesenchymal transition through matrix metalloprotease-2 downregulation in gastric cancer, *Gastric Cancer*, **25**, 850-861, doi: 10.1007/s10120-022-01305-w.

62. Pinyopornpanish, K., Phrommintikul, A., Angkurawaranon, C., Kumfu, S., Angkurawaranon, S., et al. (2022) Circulating Lipocalin-2 level is positively associated with cognitive impairment in patients with metabolic syndrome, *Sci. Rep.*, **12**, 4635, doi: 10.1038/s41598-022-08286-x.
63. Friedman, M., Lindström, S., Ekerljung, L., Andersson-Svahn, H., Carlsson, J., et al. (2009) Engineering and characterization of a bispecific HER2 x EGFR-binding affibody molecule, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **54**, 121-131, doi: 10.1042/BA20090096.
64. Gorman, K., McGinnis, J., and Kay, B. (2018) Generating FN3-based affinity reagents through phage display, *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, **10**, e39, doi: 10.1002/cpch.39.
65. Давыдова Е. К. (2022) Белковая инженерия: достижения фагового дисплея в науке и медицине, *Усп. Биол. Хим.*, **62**, 319.
66. Zhang, Y., Thangam, R., You, S.-H., Sultonova, R. D., Venu, A., et al. (2021) Engineering calreticulin-targeting monoclonal antibodies to detect immunogenic cell death in cancer chemotherapy, *Cancers (Basel)*, **13**, 2801, doi: 10.3390/cancers13112801.
67. Cetin, M., Evenson, W. E., Gross, G. G., Jalali-Yazdi, F., Krieger, D., et al. (2017) RasIns: genetically encoded intrabodies of activated Ras proteins, *J. Mol. Biol.*, **429**, 562-573, doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.008.
68. Olson, C. A., and Roberts, R. W. (2007) Design, expression, and stability of a diverse protein library based on the human fibronectin type III domain, *Protein Sci.*, **16**, 476-484, doi: 10.1110/ps.062498407.
69. Храмов Ю. В., Уласов А. В., Лупанова Т. Н., Георгиев Г. П., Соболев А. С. (2022) Доставка антителоподобных молекул, моноклоны, способных связываться с нуклеокапсидным белком вируса SARS-COV-2, в клетки-мишени, *Докл. РАН. Науки Жизни*, **506**, 68, doi: 10.31857/S2686738922050146.
70. Lipovsek, D., Lippow, S. M., Hackel, B. J., Gregson, M. W., Cheng, P., et al. (2007) Evolution of an interloop disulfide bond in high-affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: molecular convergence with single-domain camelid and shark antibodies, *J. Mol. Biol.*, **368**, 1024-1041, doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.029.
71. Riihimäki, T. A., Hiltunen, S., Rangl, M., Nordlund, H. R., Määttä, J. A. E., et al. (2011) Modification of the loops in the ligand-binding site turns avidin into a steroid-binding protein, *BMC Biotechnol.*, **11**, 64, doi: 10.1186/1472-6750-11-64.
72. Hytönen, V. P. (2020) (Strept)avidin as a template for ligands other than biotin: An overview, *Methods Enzymol.*, **633**, 21-28, doi: 10.1016/bs.mie.2019.10.029.
73. Kiss, C., Fisher, H., Pesavento, E., Dai, M., Valero, R., et al. (2006) Antibody binding loop insertions as diversity elements, *Nucleic Acids Res.*, **34**, e132, doi: 10.1093/nar/gkl681.
74. Kadonosono, T., Yabe, E., Furuta, T., Yamano, A., Tsubaki, T., et al. (2014) A fluorescent protein scaffold for presenting structurally constrained peptides provides an effective screening system to identify high affinity target-binding peptides, *PLoS One*, **9**, e103397, doi: 10.1371/journal.pone.0103397.
75. Chee, S. M. Q., Wongsantichon, J., Yi, L. S., Sana, B., Frosi, Y., et al. (2021) Functional display of bioactive peptides on the vGFP scaffold, *Sci. Rep.*, **11**, 10127, doi: 10.1038/s41598-021-89421-y.
76. Rinne, S. S., Yin, W., Borrás, A. M., Abouzayed, A., Leitao, C. D., et al. (2022) Targeting tumor cells overexpressing the human epidermal growth factor receptor 3 with potent drug conjugates based on affibody molecules, *Biomedicines*, **10**, 1293, doi: 10.3390/biomedicines10061293.
77. Sokolova, E., Kutova, O., Grishina, A., Pospelov, A., Guryev, E., et al. (2019) Penetration efficiency of antitumor agents in ovarian cancer spheroids: the case of recombinant targeted toxin DARPIn-LoPE and the chemotherapy drug, doxorubicin, *Pharmaceutics*, **11**, 219, doi: 10.3390/pharmaceutics11050219.
78. Sachdev, S., Cabalreja, C. C., and Cheloha, R. W. (2021) Strategies for targeting cell surface proteins using multivalent conjugates and chemical biology, *Methods Cell Biol.*, **166**, 205-222, doi: 10.1016/bs.mcb.2021.06.004.
79. Шипунова В. О., Деев С. М. (2022) Распознающие скаффолдовые полипептиды как инструмент для адресной доставки наноструктур *in vitro* и *in vivo*, *Acta Naturae*, **14**, 54, doi: 10.32607/actanaturae.11545.
80. Deyev, S., Proshkina, G., Baryshnikova, O., Ryabova, A., Avishai, G., et al. (2018) Selective staining and eradication of cancer cells by protein-carrying DARPIn-functionalized liposomes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **130**, 296-305, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.06.026.
81. Nazari, M., Emamzadeh, R., Jahanpanah, M., Yazdani, E., and Radmanesh, R. (2022) A recombinant affitoxin derived from a HER3 affibody and diphtheria-toxin has potent and selective antitumor activity, *Int. J. Biol. Macromol.*, **219**, 1122-1134, doi: 10.1016/j.jbiomac.2022.08.150.
82. Lipovšek, D., Carvajal, I., Allentoff, A. J., Barros, A., Brailsford, J., et al. (2018) Adnectin-drug conjugates for Glypican-3-specific delivery of a cytotoxic payload to tumors, *Protein Eng. Des. Sel.*, **31**, 159-171, doi: 10.1093/protein/gzy013.
83. Karsten, L., Janson, N., Le Joncour, V., Alam, S., Müller, B., et al. (2022) Bivalent EGFR-targeting DARPIn-MMAE conjugates, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 2468, doi: 10.3390/ijms23052468.
84. Sharma, R., Suman, S. K., and Mukherjee, A. (2022) Antibody-based radiopharmaceuticals as theranostic agents: an overview, *Curr. Med. Chem.*, **29**, 5979, doi: 10.2174/0929867329666220607160559.

85. Luo, R., Liu, H., and Cheng, Z. (2022) Protein scaffolds: antibody alternatives for cancer diagnosis and therapy, *RSC Chem. Biol.*, **3**, 830-847, doi: 10.1039/d2cb00094f.
86. Klont, F., Hadderingh, M., Horvatovich, P., Ten Hacken, N. H. T., and Bischoff, R. (2018) Affimers as an alternative to antibodies in an affinity LC-MS assay for quantification of the soluble receptor of advanced glycation end-products (sRAGE) in human serum, *J. Proteome Res.*, **17**, 2892-2899, doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00414.
87. Mayoral-Peña, K., González Peña, O. I., Orrantia Clark, A. M., Flores-Vallejo, R. D. C., Oza, G., et al. (2022) Biorecognition engineering technologies for cancer diagnosis: a systematic literature review of non-conventional and plausible sensor development methods, *Cancers (Basel)*, **14**, 1867, doi: 10.3390/cancers14081867.
88. Шилова О. Н., Деев С. М. (2019) Дарпины – перспективные адресные белки для тераностики, *Acta Naturae*, **11**, 42, doi: 10.32607/20758251-2019-11-4-42-53.
89. Shipunova, V. O., Kolesnikova, O. A., Kotelnikova, P. A., Soloviev, V. D., Popov, A. A., et al. (2021) Comparative evaluation of engineered polypeptide scaffolds in HER2-targeting magnetic nanocarrier delivery, *ACS Omega*, **6**, 16000, doi: 10.1021/acsomega.1c01811.
90. Mamluk, R., Carvajal, I. M., Morse, B. A., Wong, H., Abramowitz, J., et al. (2010) Anti-tumor effect of CT-322 as an adnectin inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2, *MAbs*, **2**, 199-208, doi: 10.4161/mabs.2.2.11304.
91. Tolmachev, V., and Orlova, A. (2020) Affibody molecules as targeting vectors for PET imaging, *Cancers (Basel)*, **12**, E651, doi: 10.3390/cancers12030651.
92. Deyev, S., Vorobyeva, A., Schulga, A., Proshkina, G., Güler, R., et al. (2019) Comparative evaluation of two DARPIn variants: effect of affinity, size, and label on tumor targeting properties, *Mol. Pharm.*, **16**, 995-1008, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00922.
93. Wang, Y., Ballou, B., Schmidt, B. F., Andreko, S., St Croix, C. M., et al. (2017) Affibody-targeted fluorogen activating protein for *in vivo* tumor imaging, *Chem. Commun. (Camb.)*, **53**, 2001, doi: 10.1039/c6cc09137g.
94. Yun, M., Kim, D.-Y., Lee, J.-J., Kim, H.-S., Kim, H.-S., et al. (2017) A high-affinity repebody for molecular imaging of EGFR-expressing malignant tumors, *Theranostics*, **7**, 2620-2633, doi: 10.7150/thno.18096.
95. Mączyńska, J., Raes, F., Da Pieve, C., Turnock, S., Boulton, J. K. R., et al. (2022) Triggering anti-GBM immune response with EGFR-mediated photo-immunotherapy, *BMC Med.*, **20**, 16, doi: 10.1186/s12916-021-02213-z.
96. Lui, B. G., Salomon, N., Wüstehube-Lausch, J., Daneschdar, M., Schmoldt, H.-U., et al. (2020) Targeting the tumor vasculature with engineered cystine-knot miniproteins, *Nat. Commun.*, **11**, 295, doi: 10.1038/s41467-019-13948-y.
97. Балалаева И. В., Крылова Л. В., Карпова М. А., Шульга А. А., Коновалова Е. В. (2023) Синергический эффект комбинированного действия таргетной и фотодинамической терапии в отношении HER2-положительного рака молочной железы, *Докл. РАН. Науки Жизни*, **508**, 48, doi: 10.31857/S268673892270007X.
98. Proshkina, G. M., Shramova, E. I., Shilova, M. V., Zelepukin, I. V., Shipunova, V. O., et al. (2021) DARPIn\_9-29-targeted gold nanorods selectively suppress HER2-positive tumor growth in mice, *Cancers (Basel)*, **13**, 5235, doi: 10.3390/cancers1320523.
99. Shramova, E., Proshkina, G., Shipunova, V., Ryabova, A., Kamyshinsky, R., et al. (2020) Dual targeting of cancer cells with DARPIn-based toxins for overcoming tumor escape, *Cancers (Basel)*, **12**, E3014, doi: 10.3390/cancers12103014.
100. Eijkenboom, L., Palacio-Castañeda, V., Groenman, F., Braat, D., Beerendonk, C., et al. (2021) Assessing the use of tumor-specific DARPIn-toxin fusion proteins for *ex vivo* purging of cancer metastases from human ovarian cortex before autotransplantation, *F. S. Sci.*, **2**, 330-344, doi: 10.1016/j.xfss.2021.09.004.
101. Xu, T., Schulga, A., Konovalova, E., Rinne, S. S., Zhang, H., et al. (2023) Feasibility of co-targeting HER3 and EpCAM using seribantumab and DARPIn-toxin fusion in a pancreatic cancer xenograft model, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2838, doi: 10.3390/ijms24032838.
102. Hanauer, J. R. H., Koch, V., Lauer, U. M., and Mühlebach, M. D. (2019) High-affinity DARPIn allows targeting of MeV to glioblastoma multiforme in combination with protease targeting without loss of potency, *Mol. Ther. Oncolytics*, **15**, 186-200, doi: 10.1016/j.omto.2019.10.004.
103. Lal, S., and Raffel, C. (2017) Using cystine knot proteins as a novel approach to retarget oncolytic measles virus, *Mol. Ther. Oncolytics*, **7**, 57-66, doi: 10.1016/j.omto.2017.09.005.
104. Strecker, M. I., Wlotzka, K., Strassheimer, F., Roller, B., Ludmirski, G., et al. (2022) AAV-mediated gene transfer of a checkpoint inhibitor in combination with HER2-targeted CAR-NK cells as experimental therapy for glioblastoma, *Oncoimmunology*, **11**, 2127508, doi: 10.1080/2162402X.2022.2127508.
105. Zajc, C. U., Salzer, B., Taft, J. M., Reddy, S. T., Lehner, M., and Traxlmayr, M. W. (2021) Driving CARs with alternative navigation tools – the potential of engineered binding scaffolds, *FEBS J.*, **288**, 2103-2118, doi: 10.1111/febs.15523.
106. Stepanov, A. V., Kalinin, R. S., Shipunova, V. O., Zhang, D., Xie, J., et al. (2022) Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2210562119, doi: 10.1073/pnas.2210562119.

107. Parfenyev, S., Singh, A., Fedorova, O., Daks, A., Kulshreshtha, R., and Barlev, N. A. (2021) Interplay between p53 and non-coding RNAs in the regulation of EMT in breast cancer, *Cell Death Dis.*, **12**, 17, doi: 10.1038/s41419-020-03327-7.
108. Lezina, L., Aksenova, V., Fedorova, O., Malikova, D., Shuvalov, O., Antonov, A. V., et al. (2015) KMT Set7/9 affects genotoxic stress response via the Mdm2 axis, *Oncotarget*, **6**, 25843-25855, doi: 10.18632/oncotarget.4584.
109. Davidovich, P., Aksenova, V., Petrova, V., Tentler, D., Orlova, D., et al. (2015) Discovery of novel isatin-based p53 inducers, *ACS Med. Chem. Lett.*, **6**, 856-860, doi: 10.1021/acsmedchemlett.5b00011.
110. Bulatov, E., Sayarova, R., Mingaleeva, R., Miftakhova, R., Gomzikova, M., et al. (2018) Isatin-Schiff base-copper (II) complex induces cell death in p53-positive tumors, *Cell Death Discov.*, **4**, 103, doi: 10.1038/s41420-018-0120-z.
111. Lau, S.-Y., Siau, J. W., Sobota, R. M., Wang, C.-I., Zhong, P., et al. (2018) Synthetic 10FN3-based mono- and bivalent inhibitors of MDM2/X function, *Protein Eng. Des. Sel.*, **31**, 301-312, doi: 10.1093/protein/gzy018.
112. Spencer-Smith, R., Koide, A., Zhou, Y., Eguchi, R. R., Sha, F., et al. (2017) Inhibition of RAS function through targeting an allosteric regulatory site, *Nat. Chem. Biol.*, **13**, 62-68, doi: 10.1038/nchembio.2231.
113. Teng, K. W., Tsai, S. T., Hattori, T., Fedele, C., Koide, A., et al. (2021) Selective and noncovalent targeting of RAS mutants for inhibition and degradation, *Nat. Commun.*, **12**, 2656, doi: 10.1038/s41467-021-22969-5.
114. Khan, I., Koide, A., Zuberi, M., Ketavarapu, G., Denbaum, E., et al. (2022) Identification of the nucleotide-free state as a therapeutic vulnerability for inhibition of selected oncogenic RAS mutants, *Cell Rep.*, **38**, 110322, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110322.
115. Wallon, L., Khan, I., Teng, K. W., Koide, A., Zuberi, M., et al. (2022) Inhibition of RAS-driven signaling and tumorigenesis with a pan-RAS monobody targeting the Switch I/II pocket, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2204481119, doi: 10.1073/pnas.2204481119.
116. Guillard, S., Kolasinska-Zwierz, P., Debreczeni, J., Breed, J., Zhang, J., et al. (2017) Structural and functional characterization of a DARPIn which inhibits Ras nucleotide exchange, *Nat. Commun.*, **8**, 16111, doi: 10.1038/ncomms16111.
117. Bery, N., Legg, S., Debreczeni, J., Breed, J., Embrey, K., et al. (2019) KRAS-specific inhibition using a DARPIn binding to a site in the allosteric lobe, *Nat. Commun.*, **10**, 2607, doi: 10.1038/s41467-019-10419-2.
118. McGee, J. H., Shim, S. Y., Lee, S.-J., Swanson, P. K., Jiang, S. Y., et al. (2018) Exceptionally high-affinity Ras binders that remodel its effector domain, *J. Biol. Chem.*, **293**, 3265-3280, doi: 10.1074/jbc.M117.816348.
119. Jung, Y. H., Choi, Y., Seo, H.-D., Seo, M.-H., and Kim, H.-S. (2023) A conformation-selective protein binder for a KRAS mutant inhibits the interaction between RAS and RAF, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **645**, 110-117, doi: 10.1016/j.bbrc.2023.01.019.
120. Schmit, N. E., Neopane, K., and Hantschel, O. (2019) Targeted protein degradation through cytosolic delivery of monobody binders using bacterial toxins, *ACS Chem. Biol.*, **14**, 916-924, doi: 10.1021/acschembio.9b00113.
121. Röth, S., Macartney, T. J., Konopacka, A., Chan, K.-H., Zhou, H., et al. (2020) Targeting endogenous K-RAS for degradation through the affinity-directed protein missile system, *Cell. Chem. Biol.*, **27**, 1151-1163.e6, doi: 10.1016/j.chembiol.2020.06.012.
122. Kim, J. W., Cochran, F. V., and Cochran, J. R. (2015) A chemically cross-linked knottin dimer binds integrins with picomolar affinity and inhibits tumor cell migration and proliferation, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 6-9, doi: 10.1021/ja508416e.
123. Gad, S., and Ayakar, S. (2021) Protein scaffolds: A tool for multi-enzyme assembly, *Biotechnol. Rep. (Amst.)*, **32**, e00670, doi: 10.1016/j.btre.2021.e00670.
124. Islam, M., Kehoe, H. P., Lissos, J. B., Huang, M., Ghabban, C. E., et al. (2021) Chemical diversification of simple synthetic antibodies, *ACS Chem. Biol.*, **16**, 344-359, doi: 10.1021/acschembio.0c00865.
125. Rabe von Pappenheim, F., Wensien, M., Ye, J., Uranga, J., Irisarri, I., et al. (2022) Widespread occurrence of covalent lysine-cysteine redox switches in proteins, *Nat. Chem. Biol.*, **18**, 368-375, doi: 10.1038/s41589-021-00966-5.
126. Maggi, M., Pessino, G., Guardamagna, I., Lonati, L., Pulimeno, C., and Scotti, C. (2021) A targeted catalytic nanobody (T-CAN) with asparaginolytic activity, *Cancers (Basel)*, **13**, 5637, doi: 10.3390/cancers13225637.
127. Fellouse, F. A., Barthelemy, P. A., Kelley, R. F., and Sidhu, S. S. (2006) Tyrosine plays a dominant functional role in the paratope of a synthetic antibody derived from a four amino acid code, *J. Mol. Biol.*, **357**, 100-114, doi: 10.1016/j.jmb.2005.11.092.
128. Birtalan, S., Zhang, Y., Fellouse, F. A., Shao, L., Schaefer, G., and Sidhu, S. S. (2008) The intrinsic contributions of tyrosine, serine, glycine and arginine to the affinity and specificity of antibodies, *J. Mol. Biol.*, **377**, 1518-1528, doi: 10.1016/j.jmb.2008.01.093.
129. Gilbreth, R. N., Esaki, K., Koide, A., Sidhu, S. S., and Koide, S. (2008) A dominant conformational role for amino acid diversity in minimalist protein-protein interfaces, *J. Mol. Biol.*, **381**, 407-418, doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.014.
130. Bonvin, P., Venet, S., Fontaine, G., Ravn, U., Gueneau, F., Kosco-Vilbois, M., et al. (2015) *De novo* isolation of antibodies with pH-dependent binding properties, *MAbs*, **7**, 294-302, doi: 10.1080/19420862.2015.1006993.

131. Hackel, B. J., and Wittrup, K. D. (2010) The full amino acid repertoire is superior to serine/tyrosine for selection of high affinity immunoglobulin G binders from the fibronectin scaffold, *Protein Eng. Des. Sel.*, **23**, 211-219, doi: 10.1093/protein/gzp083.
132. Svilenov, H. L., Sacherl, J., Protzer, U., Zacharias, M., and Buchner, J. (2021) Mechanistic principles of an ultra-long bovine CDR reveal strategies for antibody design, *Nat. Commun.*, **12**, 6737, doi: 10.1038/s41467-021-27103-z.
133. Schilling, J., Schöppe, J., and Plückthun, A. (2014) From DARPins to LoopDARPins: novel LoopDARPin design allows the selection of low picomolar binders in a single round of ribosome display, *J. Mol. Biol.*, **426**, 691-721, doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.026.

## NON-IMMUNOGLOBULIN SYNTHETIC BINDING PROTEINS FOR ONCOLOGY

### Review

**T. I. David<sup>1,2</sup>, N. B. Pestov<sup>1,3,4\*</sup>, T. V. Korneenko<sup>4</sup>, and N. A. Barlev<sup>1,3,5,6</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia*

<sup>2</sup> *Laboratory of Molecular Oncology, Phystech School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia; e-mail: nayeoff@yahoo.com*

<sup>3</sup> *Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences, 108819 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Group of Cross-Linking Enzymes, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia*

<sup>5</sup> *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St.-Petersburg, Russia*

<sup>6</sup> *School of Medicine, Nazarbayev University, 010000 Astana, Kazakhstan*

Extensive application of technologies like phage display in screening peptide and protein combinatorial libraries has not only facilitated creation of new recombinant antibodies but has also significantly enriched repertoire of the protein binders that have polypeptide scaffolds without homology to immunoglobulins. These innovative synthetic binding protein (SBP) platforms have grown in number and now encompass monobodies/adnectins, DARPins, lipocalins/anticalins, and a variety of miniproteins such as affibodies and knottins, among others. They serve as versatile modules for developing complex affinity tools that hold promise in both diagnostic and therapeutic settings. An optimal scaffold typically has low molecular weight, minimal immunogenicity, and demonstrates resistance against various challenging conditions, including proteolysis – making it potentially suitable for peroral administration. Retaining functionality under reducing intracellular milieu is also advantageous. However, paramount to its functionality is the scaffold's ability to tolerate mutations across numerous positions, allowing for the formation of a sufficiently large target binding region. This is achieved through the library construction, screening, and subsequent expression in an appropriate system. Scaffolds that exhibit high thermodynamic stability are especially coveted by the developers of new SBPs. These are steadily making their way into clinical settings, notably as antagonists of oncoproteins in signaling pathways. This review surveys the diverse landscape of SBPs, placing particular emphasis on the inhibitors targeting the oncoprotein KRAS, and highlights groundbreaking opportunities for SBPs in oncology.

**Keywords:** monobodies, adnectins, lipocalins, affibodies, DARPins, alternative scaffolds