

УДК 577.29

Дарпины – перспективные адресные белки для тераностики

О. Н. Шилова*, С. М. Деев

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: olga.shilova.n@gmail.com

Поступила в редакцию 02.09.2019

Принята к печати 08.10.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-42-53

РЕФЕРАТ Классической основой адресной терапии являются моноклональные антитела, однако разработка альтернативных связывающих белков позволила использовать в качестве нацеливающих модулей белки неиммуноглобулиновой природы. Дарпины – каркасные белки на основе анкириновых повторов, обладают такими преимуществами перед антителами, как малый размер, стабильность в широком диапазоне температур и значений pH, низкая склонность к агрегации и легкость наработки в гетерологичных системах экспрессии. Различия в строении паратопа дарпинов и антител расширяют спектр молекул-мишеней, а легкость создания гибридных белков слияния позволяет получать биспецифические и мультивалентные конструкции. В представленном обзоре суммированы данные последних лет о разработке терапевтических и визуализирующих соединений на основе дарпинов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адресная терапия, барназа, дарпин, наночастицы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DARPin – искусственный белок с анкириновыми повторами, дарпин (Designed Ankyrin Repeat Protein); scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста человека 1; EpcAM – молекула адгезии эпителиальных клеток; IgE – иммуноглобулин E.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка гибридной технологии, описанной Кёлером и Мильштейном (Kohler, Milstein) в 1975 году [1], сделала возможным получение моноклональных антител, которые стали использоваться как в исследованиях, так и в диагностике и терапии, благодаря высокой аффинности и специфичности, став той «магической пулей», на которой основана таргетная терапия. Первые терапевтические моноклональные антитела были получены в 1986 году. На данный момент Американским управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) для клинического применения одобрено 82 моноклональных антитела, и это число продолжает расти. Однако и у антител есть свои недостатки: их сравнительно большой размер (150 кДа) может ограничивать проникновение как в нормальные ткани [2], так и в солидные опухоли [3], а константная часть помимо увеличения времени циркуляции в крови может вызывать и нежелательные эффекты [4]. Кроме того, полноразмерные антитела требуют сложного фолдинга и специфического гликозилирования и потому должны нарабатываться в клетках млекопитающих, что сильно удорожает

производство. Еще одну проблему представляет гомология между белками мыши и человека, что затрудняет отбор антител к консервативным белкам.

Многие из этих трудностей были преодолены получением укороченных и одноцепочечных вариантов антител. Развитие технологии рекомбинантных антител привело к тому, что классическая иммунизация была заменена полностью синтетическими библиотеками, не зависящими от ограничений на аутоспецифичность лимфоцитов. В дальнейшем разработанные при этом методы отбора молекул по аффинности к лиганду стали применяться для других белков, что позволило обойтись без самих антител [5]. В 2018 году значимость этих работ была подтверждена присуждением Нобелевской премии по химии за изучение «Направленной эволюции ферментов и связывающих белков». Одну половину премии получила американский ученый-биоинженер Френсис Арнольд (Frances H. Arnold) «за направленную эволюцию ферментов»; вторую половину премии получили Джордж Смит (George P. Smith) и сэр Грегори Уинтер (Sir Gregory P. Winter) «за фаговый дисплей пептидов и антител». За последние 20 лет с помощью этих технологий создано множество альтернативных каркасных белков, таких,

как монободы (получены из фибронектина III типа FN3), антикарины (получены из липокалинов), аффибоды (получены из иммуноглобулинсвязывающего белка А) и дарпины (получены из анкириновых повторов). Такие белки, как и антитела, обычно имеют «константную» каркасную часть и «вариабельные» участки, замены аминокислот в которых не приводят к изменению пространственной структуры белка [6]. Получение альтернативных каркасных белков (скаффолдов) состоит из двух стадий: 1) создание библиотеки белковых вариантов путем случайного или сайт-направленного мутагенеза и 2) отбор полученных молекул с помощью фагового, дрожжевого или рибосомного дисплея, связывающего генотип (последовательность гена белка) и фенотип (способность связываться с мишенью).

К преимуществам указанных альтернативных белков можно отнести их малый размер, облегчающий проникновение в опухоль, отсутствие константной части антител, позволяющее избегать цитотоксичности, опосредованной антителами и молекулами системы комплемента, во многих случаях высокая термостабильность, позволяющая долгое время хранить препарат при комнатной температуре без потери активности, легкость наработки в микроорганизмах и даже возможность прямого химического синтеза. Кроме того, создавать и набирать биспецифические молекулы из альтернативных белков гораздо проще, чем получать биспецифические антитела. Еще одно преимущество таких молекул – независимость от иммунизации животных, что упрощает процедуру и расширяет спектр возможных молекул-мишеней за счет включения в него высококонсервативных белков [4].

Многие типы альтернативных скаффолдов созданы на основе белков с повторяющимися мотивами: лейцин-богатые повторы (leucine-rich repeat, LRR), анкириновые повторы (Ankyrin repeat, AR), повторы Armadillo (ArmRP), тетратрикопептидные повторы (TPR). Белки на основе повторов активно используются, поскольку имеют протяженную связывающую поверхность, размер которой можно варьировать, и жесткую каркасную часть, сформированную «константными» участками [7]. В данной работе обсуждаются дарпины – искусственные белки, созданные на основе анкириновых повторов. В эукариотической клетке белки, построенные из анкириновых повторов, связываются с самыми разными мишенями, обеспечивая организацию цитоскелета и регуляцию активности ферментов [8]. Исходное разнообразие таких белков использовано для создания консенсусного мотива, содержащего вариабельные участки и способного объединяться с соседними мотивами в единую жесткую структуру (рис. 1А, В).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРОЕНИЯ ДАРПИНОВ В НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И БИОТЕХНОЛОГИИ

В качестве связывающих молекул дарпины могут применяться в большинстве технологий, использующих укороченные варианты моноклональных антител. Однако помимо малого размера дарпины обладают и другими полезными свойствами. Легкость наработки в бактериях позволяет создавать белки слияния, добавлять последовательности для очистки и мечения, а отсутствие остатков цистеина в исходной молекуле дарпина позволяет ввести уникальный дополнительный цистеин для точной конъюгации.

Дарпины состоят из плотно упакованных анкириновых повторов, каждый из которых образует β -поворот и две антипараллельные α -спирали. Как правило, такой повтор состоит из 33 аминокислот, шесть из которых образуют связывающую поверхность. При создании рекомбинантных библиотек в эти позиции помещают кодоны случайных аминокислот, за исключением цистеина (чтобы избежать образования дисульфидных связей), а также глицина и пролина (так как некоторые аминокислоты входят в состав α -спирали) [6]. Как правило, дарпины образованы 2–3 связывающими мотивами, заключенными между N- и C-концевыми мотивами, экранирующими гидрофобные области (рис. 1). Дарпины – маленькие белки (14–18 кДа), чрезвычайно термостабильные (T_m , температура плавления, может достигать 90°C), устойчивые к протеазам и денатурирующим агентам. Они могут набираться в бактериях с высоким выходом – до 200 мг белка с 1 л жидкой культуры [6].

Оба конца полипептидной цепи дарпинов формируют альфа-спирали, что облегчает создание геометрически точных мультимеров. Так, на основе двух дарпинов, узнающих разные, но перекрывающиеся эпитопы зеленого флуоресцентного белка, при помощи компьютерного моделирования был создан молекулярный «зажим», обхватывающий молекулу GFP с образованием стабильного комплекса, тем не менее сохраняющего обратимость связывания. Такие зажимы были использованы для ориентированной посадки на чип для поверхностного плазмонного резонанса белков, слитых с GFP, и для хроматографической очистки таких белков на сефарозе, конъюгированной с данным дидарпином. Дидарпины, конъюгированные с флуоресцентным красителем, помогли усилить сигнал от редких GFP-меченых белков на поверхности клеток и позволили точнее детектировать их проточной цитометрией [9].

При помощи компьютерного моделирования создан дарпин, формирующий тример за счет добавленного к нему тримеризирующего мотива и связывающийся с тримерным белком аденовируса пятого

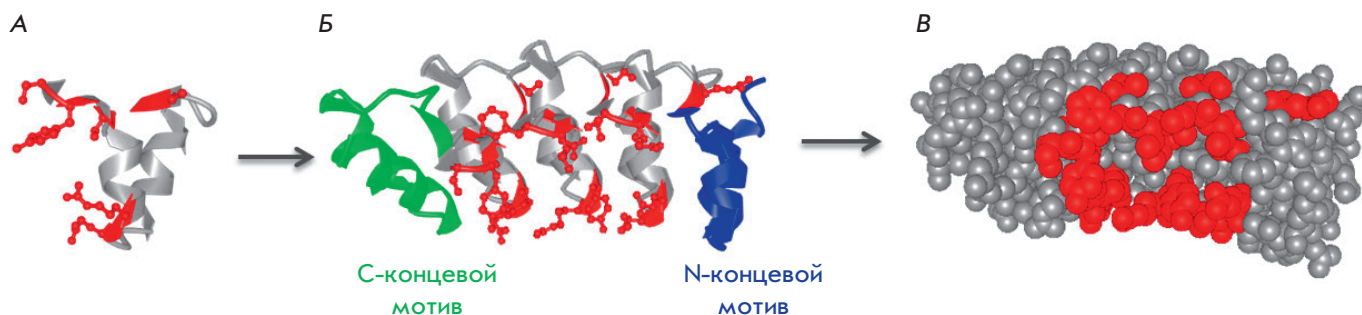


Рис. 1. Строение дарпинов. А – строение консенсусного анкиринового повтора, константная часть обозначена серым цветом, переменные участки – красным цветом. Б – строение молекулы дарпина. Два или три центральных мотива формируют связывающую поверхность за счет переменных аминокислот (обозначены красным цветом), гидрофобные участки экранированы С- и N-концевыми мотивами. В – пространственная структура дарпина, переменные аминокислоты выделены красным

серотипа (Ad5). Для этого белка была показана способность практически необратимо связываться с оболочкой аденовируса. При этом добавление еще одного дарпина, специфичного к рецептору клетки-мишени, позволило эффективно заражать клетки, экспрессирующие соответствующий онкомаркер (HER2, EGFR или EpCAM) [10].

Жесткость и малый размер дарпинов позволили создавать димеры, влияющие на проведение сигнала от внеклеточных рецепторов за счет фиксации рецепторов в определенных конформациях или сближения молекул, генерирующих конкурирующие сигналы. Так, при помощи бивалентного дарпина удалось избирательно подавить активность тучных клеток, связавших иммунные комплексы на основе IgE. Один из модулей этого димера с высокой аффинностью узнает константную часть IgE, связавшуюся с FcεRI, другой связывается с низкоаффинным FcγRIIB, оказывающим ингибирующее действие на тучные клетки. Данный рекомбинантный белок специфически подавляет дегрануляцию тучных клеток *in vivo* [11]. Аналогичный подход применен для создания биспецифического дидарпина, блокирующего проведение митогенного сигнала от рецептора HER2 и оказывающего цитотоксический эффект на HER2-положительные раковые клетки [12].

Помимо мультимеров с использованием гибких линкеров дарпины могут объединяться и в жесткие конструкции за счет введения альтернативных С- и N-концевых мотивов, имеющих общую альфа-спираль. Дарпины в таких ди- и тримерах по-прежнему могут одновременно связывать свои мишени, стабилизируя их для кристаллизации [13]. Один из таких дарпинов, улучшавший кристаллизацию партнеров, использован для создания жестких димеров с дарпинами, специфичными к JNK1, что позволило получить кристаллы этих комплексов и выявить структурные особенности, объясняющие специфичность

дарпинов к изоформе киназы и их способность ингибировать ее активность [14].

К недостаткам дарпинов как связывающих модулей можно отнести их вогнутую связывающую поверхность, жесткость и неполную рандомизацию переменных участков, что потенциально может ограничивать спектр возможных мишеней. Однако и эти ограничения можно преодолеть: для этого созданы дарпины нового поколения – LoopDARPin, в которых центральный β-поворот заменен на более длинную выпуклую петлю H3 из молекулы иммуноглобулина. Эта вставка позволила изменить геометрию антигенсвязывающей поверхности, ввести гибкий участок с большим количеством переменных аминокислотных остатков и улучшить селективность связывания [15].

Однако вогнутая связывающая поверхность дарпинов может служить и их преимуществом. Воспользоваться им позволяет еще одно свойство дарпинов – отсутствие остатков цистеина в белке, что позволяет ввести единственный цистеин в участок вблизи поверхности взаимодействия с мишенью и использовать его для конъюгации. В работе Kummer и соавт. [16] дарпин, специфичный к фосфорилированной форме ERK (pERK), был конъюгирован с мероцианиновым красителем, чувствительным к окружению – интенсивность его флуоресценции возрастает в гидрофобном окружении, т.е. когда дарпин связывается с pERK. Таким образом, создан биосенсор, позволяющий детектировать фосфорилирование ERK. Поскольку показано, что дарпин распознает не сам фосфат, а изменение конформации активационной петли [17], то этот подход может использоваться и для других белков, меняющих конформацию в ходе функционирования.

Таким образом, даже относительные недостатки дарпинов могут быть использованы для создания уникальных конструкций. В свою очередь, преиму-

щества дарпинов позволили найти множество применений этим белкам, в первую очередь в терапии и диагностике онкологических заболеваний.

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ РАКА

Принципы создания дарпинов были описаны в 2003 году [18], а уже в 2007 году эту технологию применили для создания высокоаффинных белков, связывающихся с онкомаркером HER2 [19]. Впоследствии были получены дарпины, связывающиеся с другими молекулами, вовлеченными в канцерогенез: EpCAM [20], EGFR [21], VEGF [22], HGF [22], катепсином В [23], KRAS [24] и др. Однако на сегодняшний день больше всего адресных агентов разработано на основе дарпинов, связывающихся с HER2. Очевидно, это связано с терапевтической значимостью их мишени. Белок HER2 (ErbB2) является тирозинкиназным рецептором, экспрессируемым в незначительном количестве на поверхности эпителиальных клеток человека. В норме HER2 участвует в различных внутриклеточных путях передачи сигнала, но главным образом стимулирует HER3/PI3K/Akt-путь и каскады активируемых митогенами протеинкиназ (MAP) [25], что приводит к пролиферации клеток. Антиген HER2 избыточно экспрессируется в 20–30% опухолей молочной железы и яичников, поддерживая агрессивные свойства опухоли, а определение уровня экспрессии HER2 включено в стандартные протоколы диагностики рака молочной железы [26]. Амплификация гена *ERBB2* может наблюдаться также в клетках аденокарцином желудка и кишечника [27], карцином яичника [28], эндометрия [29], предстательной железы [30], а также слюнных желез, влагалища, шейки матки и мочевого пузыря [31]. В настоящий момент в терапии HER2-положительного рака применяют два мышиных гуманизированных антитела: трастузумаб (Herceptin, Roche-Genentech), связывающийся с субдоменом IV HER2; и пертузумаб (Perjeta, Roche-Genentech), связывающийся с субдоменом II рецептора [32]. Кроме того, применяется трастузумаб, конъюгированный с ингибитором сборки микротрубочек (трастузумаб-эмтазин, Kadcyla, Roche) [33] и два химических ингибитора тирозинкиназного домена: лапатиниб (Tykerb или Tyverb, GlaxoSmithKlein) [34] и нератиниб (Nerlynx, Pfizer) [35]. Эти препараты одобрены для лечения HER2-положительного рака молочной железы, рака желудка и гастроэзофагеального рака [36], однако в ближайшем будущем показания к их применению могут быть расширены. Согласно результатам исследования MY PATHWAY, достоверный ответ на терапию трастузумабом и пертузумабом показали пациенты с 9 типами HER2-положительных опухолей: колоректальный рак (38% пациентов), рак мочевого

пузыря (33%), рак желчного пузыря (29%), рак слюнной железы (80%), немелкоклеточный рак легкого (13%), рак поджелудочной железы (22%), рак яичника (13%), рак предстательной железы и рак кожи (единичный пациент в каждом случае) [37]. Отсюда можно заключить, что потенциал HER2-специфичной таргетной терапии не исчерпывается раком молочной железы и желудка. При этом существующая таргетная HER2-направленная терапия действительно повышает эффективность лечения, однако полное излечение или продолжительность жизни пациентов более 5 лет по-прежнему являются редкими событиями, что стимулирует поиск новых препаратов.

Основные способы применения дарпинов в разработке препаратов для диагностики и терапии рака суммированы на рис. 2.

Визуализация опухоли важна для предклинических испытаний препаратов на животных, для установления диагноза пациенту и оценки эффективности терапии. В животных моделях могут применяться флуоресцентные дальнекрасные белки, позволяющие осуществлять прижизненную визуализацию, такие, как mCherry [38]. На основе mCherry и HER2-специфичного DARPIn 9_29 создан рекомбинантный белок DARPIn-mCherry, специфично окрашивающий HER2-положительные раковые клетки [39] и использующийся для функционализации наночастиц [40–43] как описано ниже.

В случае визуализации опухоли в организме человека применяют радионуклиды, избирательно накапливающиеся в опухоли. Мономерные дарпины могут служить связывающими модулями для радиоиммунной диагностики, использующей высокоаффинный белок, конъюгированный с носителем радионуклида, как правило, хелатором или квазиковалентными комплексами технеция [44]. Исходно эта технология была разработана для одноцепочечных антител, однако вскоре ее применили и для других каркасных белков, так как основные требования, предъявляемые к связывающим модулям для радиоиммунной диагностики, включают высокую аффинность и малый размер [45, 46]. Дарпины, сочетающие в себе оба этих свойства, могут успешно использоваться для радиоактивной визуализации опухолей. Так, на основе HER2-специфичных дарпинов G3 и 9_29 получены конъюгаты с желаемой фармакокинетикой и пониженным накоплением в печени [47–49].

Что касается терапии рака, то дарпины могут служить как для доставки токсических модулей, так и для ингибирования сигнальных путей клетки за счет специфического связывания мембранных рецепторов. Биспецифический дидарпин с линкером определенной длины дал возможность зафиксировать внеклеточные части соседних рецепторов HER2

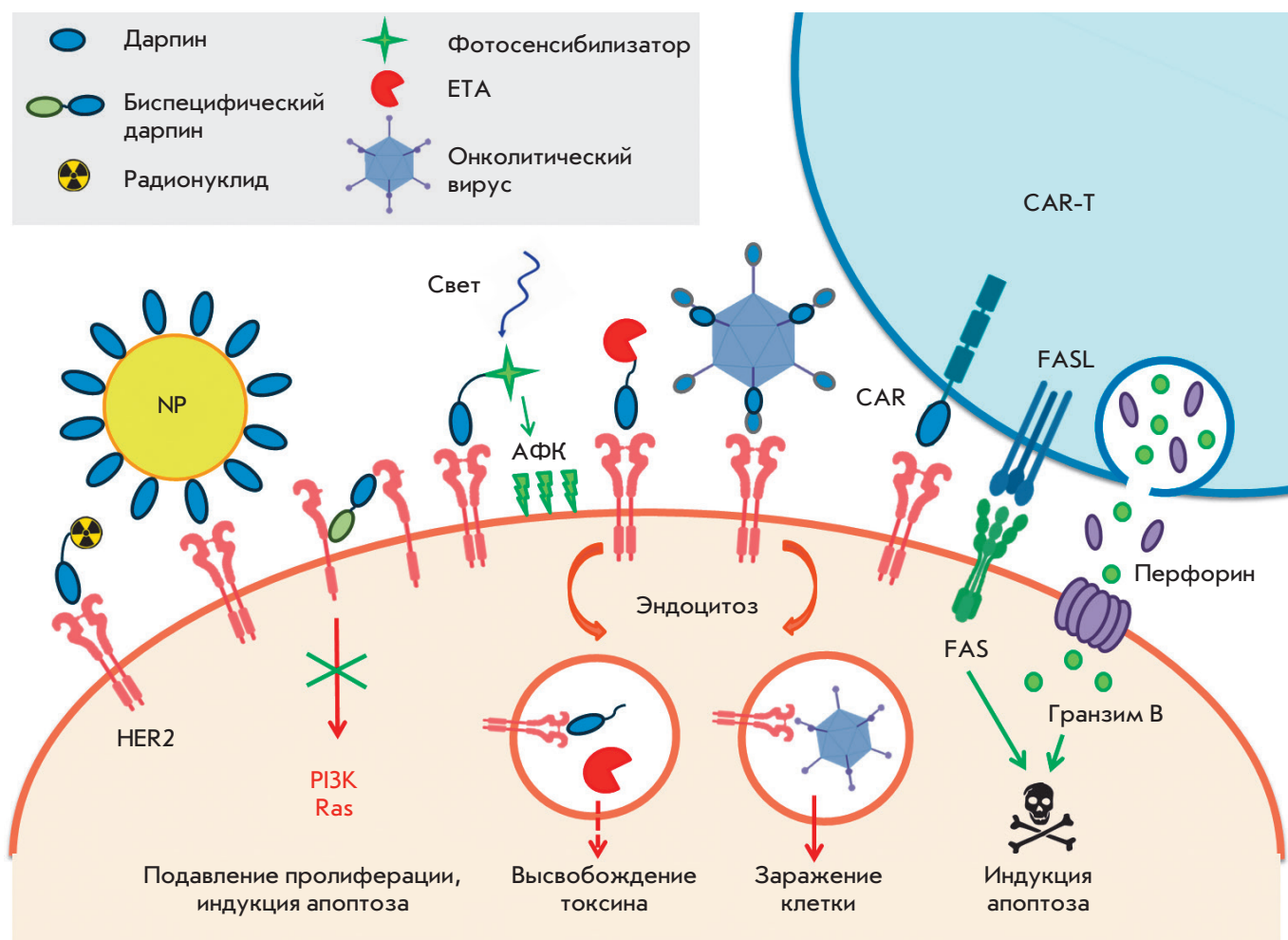


Рис. 2. Применение дарпинов для визуализации и уничтожения раковых клеток. Дарпины могут ингибировать сигнальные молекулы клетки, подавляя пролиферацию клеток или служить направляющими модулями для доставки различных агентов: радионуклидов, наночастиц или липосом, фотосенсибилизаторов, белковых токсинов, онколитических вирусов и лимфоцитов с химерными антигенными рецепторами. HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2, NP – наночастица, АФК – активные формы кислорода, PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, Ras – малая GTP-аза Ras, CAR – химерный антигенный рецептор, CAR-T – Т-лимфоцит, несущий на поверхности химерный антигенный рецептор, FAS – рецептор смерти (CD95, APO-1) индуктор внешнего пути запуска апоптоза, FASL – лиганд рецептора FAS (CD95L, CD178), ETA – укороченный вариант экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*

в нефункциональной конформации, не позволяющей образовывать димеры и проводить митогенный сигнал, что вызывало цитостатический и цитотоксический эффект для HER2-зависимых раковых клеток [12]. На основе этого димера создан препарат MP0274, тетрадарпин, содержащий модули, распознающие домены I и IV рецептора HER2, и два модуля, связывающихся с сывороточным альбумином человека, которые увеличивают время циркуляции белка в крови. В 2017 году началась I стадия клинических испытаний этого препарата [50].

Клинические испытания проходит и еще один мультивалентный дарпин – MP0250. Этот белок со-

держит в одной полипептидной цепи модуль, специфичный к фактору роста эндотелия сосудов VEGF-A, модуль, специфичный к фактору роста гепатоцитов HGF, и два модуля, связывающиеся с сывороточным альбумином человека [22]. Таким образом, препарат ингибирует сразу два важных для раковых клеток сигнальных пути: VEGF/VEGFR и HGF/cMet, а связывание с альбумином позволяет добиться длительной циркуляции. MP0250 – первый мультимерный дарпин, проверенный на пациентах [51], в ходе первой фазы клинических испытаний этот препарат хорошо переносился в дозах, достаточных для подавления активности VEGF. В 2018 году началась Ib/II

стадия клинических испытаний MP0250 в сочетании с осимертинибом для лечения пациентов с неплазматическим немелкоклеточным раком легкого (non-squamous non-small cell lung cancer, NSCLC) с мутировавшим EGFR [52]. В 2017 году началась II стадия клинических испытаний MP0250 в сочетании с бортезомибом и дексаметазоном для лечения пациентов с резистентной и рецидивирующей множественной миеломой (refractory and relapsed multiple myeloma, RRMM) [53].

Еще один способ создания дарпинов с желаемой фармакокинетикой – конъюгация с полиэтиленгликолем и применение конъюгатов локально. Один из таких конъюгатов, специфичный к VEGF абиципар, применяется при возрастной дегенерации сетчатки (neovascular age-related macular degeneration, ADE) и диабетическом макулярном отеке (diabetic macular edema, DME) [54]. Этот препарат находится на третьей стадии клинических испытаний.

ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ТОКСИНЫ НА ОСНОВЕ ДАРПИНОВ

Легкость получения дарпинов в бактериальной системе экспрессии дала толчок к созданию противоопухолевых агентов на основе белковых токсинов. Экзотоксин *A Pseudomonas aeruginosa* (PE, ETA) является одним из наиболее эффективных индукторов апоптоза за счет собственной ферментативной активности, угнетающей трансляцию. PE состоит из трех доменов: домен I специфичен к рецептору α -2-микроглобулина животных клеток (LRP1, CD369), он обеспечивает интернализацию молекулы токсина в клетку; домен II содержит сайты протеолиза фурином и дисульфидные связи, восстанавливаемые белок-дисульфидизомеразами, участвующими таким образом во внутриклеточном процессинге молекулы; домен III обладает собственной каталитической активностью – ADP-рибозилирует эукариотический eEF2, блокируя тем самым биосинтез белка в клетке, что в итоге приводит к ее гибели [55]. Доменное строение экзотоксина дает возможность использовать его укороченные варианты, сохраняющие каталитическую активность, заменяя при этом собственный связывающий домен на направляющие молекулы желаемой специфичности. При этом агенту достаточно проникнуть в эндосому, где эффекторный модуль отрезается фуриновой протеазой, после чего токсин при помощи сигнала ретроградного транспорта KDE1 транспортируется в эндоплазматический ретикулум, откуда высвобождается в цитозоль [56].

Дарпин Ec4, специфичный к ErCAM, использован для доставки укороченного варианта экзотоксина *A P. aeruginosa* к клеткам рака прямой кишки линии HT29. Полученный белок DARPin-ETA показал про-

тивоопухолевую активность как *in vitro*, так и *in vivo* [57]. ETA был использован и для подавления роста HER2-положительных опухолей. Поскольку DARPin 9_29 эффективно вызывает интернализацию HER2 в комплексе с присоединившимся белком [58], этот адресный модуль хорошо подходит для доставки фрагментов экзотоксина к раковым клеткам. На основе модуля DARPin 9_29 и фрагмента экзотоксина *A P. aeruginosa* массой 40 кДа был создан адресный токсин DARPin-PE40, который успешно индуцировал апоптоз в клетках, сверхэкспрессирующих HER2, проявляя избирательную токсичность *in vitro*, и эффективно подавлял рост клеток рака молочной железы в ксенографтной модели [59].

Одну из проблем противоопухолевых агентов на основе псевдомонадного экзотоксина представляет их высокая иммуногенность. Будучи белком бактериального происхождения, ETA вызывает образование нейтрализующих антител, которые снижают эффективность терапии и повышают риск анафилактических реакций. Для решения этой проблемы разработаны различные подходы: мутагенез PE с последующей химической модификацией (ПЭГилированием), подавление иммунной системы пациента, выявление и элиминация путем мутагенеза иммунодоминантных эпитопов В- и Т-лимфоцитов. Последний из названных подходов наиболее универсален и совместим с разными схемами терапии опухолей [60]. DARPin-LoPE, содержащий фрагмент экзотоксина с удаленными или мутированными иммунодоминантными эпитопами, показал избирательную токсичность в отношении HER2-сверхэкспрессирующих клеток *in vitro* в пикомолярном диапазоне концентраций [61] и эффективно подавлял рост клеток рака яичника в ксенографтной модели [62]. При этом неспецифическая токсичность и иммуногенность DARPin-LoPE были ниже, чем у DARPin-PE40, и вклад дарпина в эти побочные эффекты был незначительным.

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ В АДРЕСНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Фотодинамическая терапия рака полагается на использование фотосенсибилизаторов, которые под действием света определенной длины волны заставляют кислород переходить в активные формы, основной из которых является синглетный кислород (1O_2) [63]. Преимущество фотодинамической терапии по сравнению с химиотерапией состоит в меньшем воздействии на нормальные ткани, поскольку освещению подвергается только определенная часть тела. Однако и такая локализация воздействия не позволяет полностью избежать таких побочных эффектов, как сенсibilизация кожи

и сетчатки глаза. Для решения этой проблемы применяются два подхода: увеличение селективности накопления фотосенсибилизатора в опухоли за счет физико-химических свойств самой молекулы и ковалентное присоединение адресных модулей к фотосенсибилизатору (таргетная фотодинамическая терапия) [64]. Первыми адресными молекулами, использованными для специфической доставки фотосенсибилизатора в опухоль, стали моноклональные антитела. Этот подход получил развитие после работы Mew D. и соавт., в которой была показана возможность прямой конъюгации гематопорфирина с моноклональным антителом к антигену миосаркомы и обнаружено преимущество полученного иммуноконъюгата перед гематопорфирином *in vivo* [65]. Дальнейшее развитие адресной фотодинамической терапии привело к созданию конъюгатов, использующих и другие нацеливающие модули, избирательно накапливающиеся в опухоли благодаря особенностям биохимии и сигнальных путей малигнизированных клеток. Так, в случае опухолей, зависимых в своем развитии от фолиевой кислоты, предложено использовать конъюгаты фотосенсибилизаторов с фолиевой кислотой. Разрабатываются пептидные лиганды, служащие средством доставки химических фотосенсибилизаторов в опухоли, клетки которых содержат на поверхности специфические интегрин и рецепторы гормонов [66].

Конъюгаты антител и фотосенсибилизаторов эффективно устраняют раковые клетки, несущие известные поверхностные маркеры, в опытах *in vitro* и *in vivo* [67]. Однако метод химической конъюгации фотосенсибилизаторов и антител имеет и ряд недостатков, таких, как низкая воспроизводимость синтеза конъюгатов, агрегация, наличие в препарате примесей неконъюгированного фотосенсибилизатора, потеря аффинности антитела к рецептору и изменение физических свойств фотосенсибилизатора [68].

Кардинальным решением этих проблем является создание генетически кодируемых гибридных молекул, содержащих и фототоксин, и направляющую часть. Это позволяет исключить необходимость химической конъюгации составных частей и сразу нарабатывать единые рекомбинантные молекулы постоянного состава, что предопределяет их стабильно воспроизводимую функциональность. Создание таких фотосенсибилизаторов стало возможным с открытием фототоксических белков, способных продуцировать активные формы кислорода при облучении светом определенной длины волны. На сегодняшний день известно два типа фототоксических белков. Это белки KillerRed [69] и KillerOrange [70], производные GFP *Aequorea victoria*, и белки miniSOG [71] и miniSOG2 [72] – производные фототропина *Arabidopsis thaliana*.

Дарпин 9_29 был использован для доставки к раковым клеткам фототоксического белка miniSOG (miniSinglet Oxygen Generator). Этот белок получен из LOV2 (Light Oxygen Voltage) домена фототропина 2 (AtPhot2) путем сайт-специфического мутагенеза. LOV-домен в качестве кофактора содержит флавинонуклеотид (FMN), который возбуждается под действием синего света, после чего энергия возбужденного состояния расходуется на образование ковалентной связи с консервативным цистеином-426. Замена цистеина-426, вступающего в эту реакцию, на глицин привела к изменению активности белка: в ответ на облучение синим светом вся энергия возбужденного состояния FMN расходуется на образование синглетного кислорода. После дополнительного мутагенеза был отобран вариант с квантовым выходом синглетного кислорода 0.47 ± 0.05 . Спектр поглощения miniSOG имеет два пика, соответствующих 448 и 473 нм, максимумы спектра флуоресценции приходятся на 500 и 528 нм [71].

Исходно белок miniSOG был разработан как генетически кодируемый маркер для электронной микроскопии: miniSOG генерирует синглетный кислород в количествах, достаточных для инициации процесса окислительной полимеризации диаминобензидина (DAB). Полимер, получаемый при окислении DAB, взаимодействует с тетраоксидом осмия, и продукт этой реакции служит меткой для электронной микроскопии. Наряду с этим существует возможность использования miniSOG в качестве токсического модуля для изучения онтогенеза, избирательной инактивации белков и применения в фотодинамической терапии [73–75].

На основе анти-HER2-мини-антитела и фототоксического белка miniSOG создан генетически кодируемый иммунофотосенсибилизатор 4D5scFv-miniSOG, который селективно уничтожает HER2-положительные клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 при облучении. Показано, что в отношении этих раковых клеток 4D5scFv-miniSOG проявляет цитотоксический эффект, в 8 раз превосходящий эффект химического конъюгата порфирина с таким же адресным доменом [76]. Однако суперпродукция 4D5scFv-miniSOG в бактериях приводит к тому, что большая часть целевого белка находится в тельцах включения, и его ренатурация идет неэффективно. Замена адресного модуля на HER2-специфичный DARPIn 9_29 помогла решить проблему наработки целевого белка в бактериях в растворимом виде и добиться выхода 15 мг с 1 л жидкой культуры. DARPIn-miniSOG показал избирательную токсичность в отношении HER2-сверхэкспрессирующих клеток аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 *in vitro* [77]. Интересно,

что благодаря флуоресцентным свойствам DARPin-miniSOG удалось оценить скорость интернализации и рециклизации HER2 [58], а также сравнить скорости интернализации 4D5scFv и DARPin 9_29 в комплексе с данным рецептором [78]. Тем не менее, для визуализации HER2-положительных раковых клеток предпочтительны другие флуоресцентные модули или красители, так как miniSOG имеет довольно низкий квантовый выход флуоресценции, а спектр излучения перекрывается с аутофлуоресценцией [79].

Дарпины могут также использоваться для доставки фототоксичных наночастиц, позволяя создавать многофункциональные противоопухолевые агенты, что мы обсудим далее.

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ НАНОЧАСТИЦ

Наноструктуры находят все более широкое применение в фундаментальных исследованиях, диагностике и терапии различных заболеваний. Некоторые виды наночастиц исходно обладают уникальными характеристиками, позволяющими использовать их для эффективного контрастирования патогенных очагов с помощью рентгеновского, инфракрасного, акустического и других видов электромагнитных излучений. Больше всего разработок ведется в области противоопухолевых наночастиц, в первую очередь из-за того, что несовершенная васкуляризация и дезорганизация клеточных контактов опухоли позволяют многим типам наночастиц проникать в опухоли более эффективно, чем в нормальные ткани [80, 81]. Преимуществом наночастиц перед низкомолекулярными и белковыми препаратами является возможность объединять в одном агенте несколько функций, в том числе нацеливать частицу на раковые клетки при помощи поверхностных модификаций. Часто с этой целью используют моноклональные антитела, однако для полноразмерных антител по-прежнему остаются актуальными проблемы их правильной ориентации и стандартизации числа антител на одной частице [82]. Помимо антител и их фрагментов для доставки наночастиц могут использоваться альтернативные скаффолды, белки, специфично поглощающиеся опухолью, такие, как факторы роста и трансферрин, аптамеры и низкомолекулярные вещества, например фолиевая кислота [56, 57].

Как и моноклональные антитела, дарпины могут использоваться для функционализации наночастиц [83]. DARPin 9_29 был использован для доставки в опухоль апконвертирующих наночастиц для фотодинамической терапии. Частицы состава $\text{NaYF}_4:\text{Yb}_3^+\text{Tm}_3^+/\text{NaYF}_4$, испускающие ультрафи-

олетовое излучение под действием инфракрасного излучения, были покрыты белком DARPin-mCherry [39], позволяющим визуализировать опухолевые клетки за счет флуоресцентного дальнекрасного модуля mCherry [40]. DARPin 9_29 и содержащий его DARPin-mCherry использованы также для покрытия золотых наночастиц диаметром 5 нм [41] и золотых наностержней [42]. Дарпин эффективно связывался с поверхностью частицы, формируя оболочку в среднем из 35 молекул белка, уменьшая склонность частиц к агрегации. При этом присоединение дарпина к частице оставляло свободным его участок взаимодействия с HER2, что обеспечивало избирательное связывание полученных наночастиц с HER2-гиперэкспрессирующими клетками [41].

Дарпины и белки на их основе успешно присоединяются к наночастицам при помощи карбодии-мидной конъюгации. DARPin 9_29 был ковалентно присоединен к апконвертирующим радиоактивным наночастицам, покрытым сополимером малеинового ангидрида с 1-октадеценом (PMAO). Полученные наночастицы были использованы для визуализации опухоли молочной железы в ксенографтной мышечной модели и показали низкую побочную токсичность *in vivo* [84]. Тот же способ конъюгации был применен для функционализации апконвертирующих наночастиц белком DARPin-mCherry [43]. DARPin-PE40 был таким же образом присоединен к апконвертирующим радиоактивным наночастицам, что позволило визуализировать опухоли *in vivo* и эффективно уничтожать HER2-сверхэкспрессирующие клетки как *in vitro*, так и *in vivo* [85]. Введение уникального остатка цистеина позволило конъюгировать HER2-специфичный дарпин G3 с флуоресцеинмалеимидом, а затем соединить меченый дарпин с суперпарамагнитными наночастицами, покрытыми полимолочной кислотой, путем активации ее С-концевых карбоксильных групп карбодиимидом [86]. Дарпин был присоединен к наноструктурам и при помощи малеимидной конъюгации. Таким образом дарпин 9_29 был соединен с ЕТА-содержащими липосомами, функционализированными по поверхности реактивом Траута [87].

Таким образом, стандартные методики присоединения иммуноглобулинов к наночастицам применимы и к дарпинам. Однако дарпины могут включаться в наноструктуры и за счет встраивания в белки слияния, взаимодействующие с поверхностью частицы. Такой подход позволяет не только добиться желаемой ориентации связывающего модуля, но и собирать нацеливающие модули по принципу конструктора. Так, белок DARPin-Bn, состоящий из DARPin 9_29, гибкого линкера и рибонуклеазы барназы, использован для создания адресных кремниевых наноча-

стиц. Эти наночастицы покрыты белком барстар, содержащим кремнийсвязывающий пептид (SBP-Bs), обеспечивающий прикрепление SBP-Bs к частице. Поскольку барназа и барстар связываются друг с другом с очень высокой аффинностью ($K_a = 10^{14} \text{ M}^{-1}$), их использование позволяло собрать функциональный слой наночастиц в растворе без применения конъюгации или реализовать стратегию претаргетинга, доставляя к клеткам адресный белок, к которому впоследствии присоединялась наночастица [88]. Слияние барназы с пептидом, связывающимся с поверхностью магнетита, позволило использовать тот же белок DARPIn-Vn для функционализации наночастиц из магнетита и их доставки к раковым клеткам [89].

Таким образом, дарпины могут использоваться для создания адресных наночастиц наравне с антителами и их фрагментами. Более того, их малый размер и простота наработки в бактериях, в том числе в виде белков слияния, предоставляют уникальные возможности для сохранения аффинности и специфичности связывания за счет благоприятной ориентации молекулы.

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ

Молекулы, полученные из вирусов и бактерий, широко используются для создания противоопухолевых агентов [81], но для разрушения опухолевых клеток можно использовать и целые репликативно активные вирусы [90]. Онколитические вирусы – новый, очень своеобразный класс терапевтических препаратов, во многом действующих в организме пациента самостоятельно. Некоторые вирусы обладают природной тропностью к опухолевым клеткам, но чаще для создания онколитических агентов используют вирусы, поддающиеся перенацеливанию путем модификации поверхностных белков, такие, как вирус кори, аденовирус, вирус везикулярного стоматита, вирус коровьей оспы и вирус простого герпеса [90]. Можно изменить природную специфичность вируса за счет адаптерных биспецифических белков, как это успешно сделано для аденовирусов при помощи тримеризующихся дарпинов [10], однако чаще применяется слияние нацеливающих модулей с белками оболочки, поскольку в этом случае все свойства вируса кодируются его геномом. Дарпины, как и одноцепочечные антитела, могут использоваться для подобного изменения специфичности, причем их малый размер позволяет успешно встраивать последовательности, кодирующие дарпины в вирусные векторы.

Белок оболочки вируса кори был модифицирован дарпинами, специфичными к HER2, EGFR или EpCAM. Полученные при этом вирусные ча-

стицы теряли тропность к естественным рецепторам и избирательно заражали клетки, избыточно экспрессирующие соответствующий опухолевый маркер. Вирусные частицы, несущие на поверхности дарпин, специфичный к HER2, вызывали лизис клеток более эффективно, чем вирус, функционализированный HER2-специфичным одноцепочечным антителом. Использование двух соединенных линкером дарпинов, узнающих HER2 и EpCAM, позволило создать биспецифические вирусные частицы, сохранившие высокую цитолитическую активность, характерную для моноспецифичных вирионов [91, 92].

Для заражения HER2-положительных опухолевых клеток использовали также аденоассоциированный вирус, покрытый модифицированным белком оболочки VP2, слитым с дарпином. Полученные вирионы специфически заражали HER2-положительные клетки и доставляли векторы с генами люциферазы либо тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) к клеткам SK-OV-3 *in vivo*. Вирусные частицы, содержащие генотерапевтический вектор, кодирующий HSV-TK, в сочетании с генциклавиром эффективно подавляли рост ксенографтной опухоли, не вызывая гепатотоксичности [93]. Аналогичные вирусные частицы созданы с использованием EGFR-специфичных дарпина и аффибоди, и оба препарата показали избирательную токсичность в отношении EGFR-положительных клеток *in vitro* [94].

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Накопление знаний о функционировании иммунной системы позволило создать технологию адресной терапии рака, использующей цитотоксические лимфоциты – Т-лимфоциты и NK-клетки. Для этого лимфоциты трансдуцируют конструкциями, кодирующими химерный антигенный рецептор (Chimeric Antigen Receptor, CAR), специфичный к опухолевому антигену и имеющий все необходимые для активации клетки домены, включая сигнальные последовательности костимулирующих молекул обычного рецептора [95]. При активации через химерные рецепторы лимфоциты секретируют провоспалительные цитокины и запускают апоптоз клеток-мишеней через рецептор FAS, инициирующий внешний путь активации апоптоза, и гранзимы, напрямую активирующие эффекторные каспазы и каспазо-независимые пути клеточной гибели [96]. Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-T) успешно борются с гематологическими опухолями, устойчивыми к химиотерапии, позволяя добиться полного излечения большого числа пациентов [97, 98]. Большинство разработанных на сегодняшний день химерных рецепторов содержат в качестве анти-

генраспознающего домена одноцепочечный вариант антитела, однако дарпины также могут определять специфичность CAR. Более того, дарпины имеют некоторые преимущества перед одноцепочечными антителами: они компактнее, а значит, кодирующие их последовательности занимают меньше места в трансдуцирующем лимфоциты вирусном векторе; дарпины более термодинамически стабильны; и наконец, их связывающая поверхность сформирована единственным полипептидом, в отличие от антител, чей паратоп образован двумя иммуноглобулиновыми доменами, происходящими из разных полипептидов, а значит, дарпины могут использоваться для создания мультиспецифичных CAR [99].

CAR-T с рецептором на основе HER2-специфичного дарпина G3 имели такой же уровень активации, как и клетки с химерным рецептором, содержащим одноцепочечное антитело FRP5. При этом дарпинсодержащие CAR-T проявляли высокую токсичность в отношении HER2-положительных раковых клеток и низкую – в отношении контрольных клеток, не экспрессирующих HER2 [99]. Сходные результаты получены при сравнении CAR-T-терапии на основе антитела 4D5 и дарпинов G3 и 9_29. Все исследованные типы клеток специфически узнавали HER2 и проявляли высокую цитотоксичность в отношении HER2-положительных клеток *in vitro*, наиболее выраженную у клеток с рецепторами на основе дарпина G3. В ксенорафтной модели рака яичника различия между CAR-T на основе разных дарпинов проявились ярче: клетки с рецепторами на основе 4D5scFv и дарпина G3 лучше инфильтрировали опухоль и эффективнее подавляли ее рост [100]. В целом можно заключить, что CAR-T на основе дарпинов не уступают T-лимфоцитам с искусственными рецепторами, содержащими одноцепочечные антитела, а сравнительная простота получения дарпинов и их мономерность облегчают создание химерных рецепторов к разным мишеням.

Естественные киллерные клетки (NK) также могут служить агентами для распознавания опухолевых клеток при помощи химерных антигенных рецепторов. Их цитотоксичность основана на тех же механиз-

мах, что и активность CD8⁺ T-клеток, а природный путь активации дает CAR-NK некоторые преимущества перед CAR-T. NK-клетки не распознают пептид в комплексе с МНС I [101], что снижает риск запуска реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Это свойство уже используется в терапии рака переливанием донорских NK-клеток [102–104] или даже клеток стабильной линии NK-92 [105, 106], что увеличивает эффективность терапии даже без экспрессии клетками химерных рецепторов. Это позволяет создавать препараты на основе стабильных линий NK-клеток, не получая клетки от пациента [107]. К дополнительным преимуществам NK-клеток относится наличие собственных механизмов распознавания перерожденных клеток, которые позволяют им оставаться эффективными противоопухолевыми агентами даже при утрате или мутации химерных антигенных рецепторов. На сегодняшний день не создано противоопухолевых CAR-NK на основе дарпинов, однако их появление, скорее всего, не заставит себя долго ждать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дарпины были разработаны как каркасные белки, альтернативные антителам. Они нашли применение в большинстве технологий, где исходно использовались антитела, за исключением тех случаев, где необходимы свойства константной части молекул иммуноглобулинов. Такие преимущества дарпинов, как малый размер, отсутствие необходимости в иммунизации животных и легкость получения белков слияния, делают их перспективными инструментами для исследований и эффективными компонентами терапевтических и диагностических агентов. Не следует делать вывод, что альтернативные каркасные белки полностью заменят антитела, однако можно с уверенностью говорить, что они существенно дополнили набор используемых адресных белков, расширив спектр мишеней за счет другого строения паратопа и предоставив исключительные возможности для создания биспецифических и мультвалентных конструкций. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского
научного фонда (№ 19-14-00112).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kohler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. № 5517. P. 495–497.
- Shah D.K., Betts A.M. // MAbs. 2013. V. 5. № 2. P. 297–305.
- Chauhan V.P., Stylianopoulos T., Boucher Y., Jain R.K. // Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 2011. V. 2. № 1. P. 281–298.
- Simeon R., Chen Z. // Protein Cell. 2018. V. 9. № 1. P. 3–14.
- Jost C., Plückthun A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2014. V. 27. № 1. P. 102–112.
- Plückthun A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2015. V. 55. № 1. P. 489–511.
- Grove T.Z., Cortajarena A.L., Regan L. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2008. V. 18. № 4. P. 507–515.
- Stumpp M.T., Binz H.K., Amstutz P. // Drug Discov. Today. 2008. V. 13. № 15–16. P. 695–701.
- Hansen S., Stüber J.C., Ernst P., Koch A., Bojar D., Batyuk A., Plückthun A. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 16292.
- Dreier B., Honegger A., Hess C., Nagy-Davidescu G., Mittl P.R.E., Grutter M.G., Belousova N., Mikheeva G., Krasnykh V., Plückthun A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 10. P. E869–E877.
- Zellweger F., Gasser P., Brigger D., Buschor P., Vogel M., Eggel A. // Allergy. 2017. V. 72. № 8. P. 1174–1183.

12. Jost C., Schilling J., Tamaskovic R., Schwill M., Honegger A., Plückthun A. // *Structure*. 2013. V. 21. № 11. P. 1979–1991.
13. Wu Y., Batyuk A., Honegger A., Brandl F., Mittl P.R.E., Plückthun A. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 11217.
14. Wu Y., Honegger A., Batyuk A., Mittl P.R.E., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2018. V. 430. № 14. P. 2128–2138.
15. Schilling J., Schöppe J., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2014. V. 426. № 3. P. 691–721.
16. Kummer L., Hsu C.-W., Dagliyan O., MacNevin C., Kaufholz M., Zimmermann B., Dokholyan N.V., Hahn K.M., Plückthun A. // *Chem. Biol.* 2013. V. 20. № 6. P. 847–856.
17. Kummer L., Parizek P., Rube P., Millgramm B., Prinz A., Mittl P.R.E., Kaufholz M., Zimmermann B., Herberg F.W., Pluckthun A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 34. P. E2248–E2257.
18. Forrer P., Stumpp M.T., Binz H.K., Plückthun A. // *FEBS Lett.* 2003. V. 539. № 1–3. P. 2–6.
19. Stumpp M.T., Amstutz P. // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2007. V. 10. № 2. P. 153–159.
20. Winkler J., Martin-Killias P., Plückthun A., Zangemeister-Wittke U. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 9. P. 2674–2683.
21. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 5. P. 1211–1227.
22. Binz H.K., Bakker T.R., Phillips D.J., Cornelius A., Zitt C., Göttler T., Sigrist G., Fiedler U., Ekawardhani S., Dolado I., et al. // *MAbs*. 2017. V. 9. № 8. P. 1262–1269.
23. Kramer L., Renko M., Završnik J., Turk D., Seeger M.A., Vasiljeva O., Grütter M.G., Turk V., Turk B. // *Theranostics*. 2017. V. 7. № 11. P. 2806–2821.
24. Bery N., Legg S., Debreczeni J., Breed J., Embrey K., Stubbs C., Kolasinska-Zwierz P., Barrett N., Marwood R., Watson J., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2607.
25. Yarden Y., Sliwkowski M.X. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. № 2. P. 127–137.
26. Ménard S., Tagliabue E., Campiglio M., Pupa S.M. // *J. Cell. Physiol.* 2000. V. 182. № 2. P. 150–162.
27. Tal M., Wetzler M., Josefberg Z., Deutch A., Gutman M., Assaf D., Kris R., Shiloh Y., Givol D. // *Cancer Res.* 1988. V. 48. P. 1517–1520.
28. Bookman M.A., Darcy K.M., Clarke-Pearson D., Boothby R.A., Horowitz I.R. // *J. Clin. Oncol.* 2003. V. 21. № 2. P. 283–290. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525520>
29. Santin A.D., Bellone S., Roman J.J., McKenney J.K., Pecorelli S. // *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2008. V. 102. № 2. P. 128–131.
30. Zhang S., Zhang H.S., Reuter V.E., Slovin S.F., Scher H.I., Livingston P.O. // *Clin. Cancer Res.* 1998. V. 4. № 2. P. 295–302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516914>
31. The AACR Project GENIE Consortium. // *Cancer Discov.* 2017. V. 7. № 8. P. 818–831.
32. Nahta R., Hung M., Esteva F.J. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 2343–2346.
33. Junttila T.T., Li G., Parsons K., Phillips G.L., Sliwkowski M.X. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. V. 128. № 2. P. 347–356.
34. Scaltriti M., Rojo F., Ocaña A., Anido J., Guzman M., Cortes J., Di Cosimo S., Matias-Guiu X., Ramon y Cajal S., Arribas J., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2007. V. 99. № 8. P. 628–638.
35. Deeks E.D. // *Drugs*. 2017. V. 77. № 15. P. 1695–1704.
36. Meric-Bernstam F., Johnson A.M., Ileana Dumbrava E.E., Raghav K., Balaji K., Bhatt M., Murthy R.K., Rodon J., Piha-Paul S.A. // *Clin. Cancer Res.* 2019. V. 25. № 7. P. 2033–2041.
37. Hainsworth J.D., Meric-Bernstam F., Swanton C., Hurwitz H., Spigel D.R., Sweeney C., Burris H.A., Bose R., Yoo B., Stein A., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2018. V. 36. № 6. P. 536–542.
38. Borovjagin A.V., McNally L.R., Wang M., Curriel D.T., MacDougall M.J., Zinn K.R. // *Mol. Imaging*. 2010. V. 9. № 2. P. 59–75.
39. Миронова К.Е., Черных О.Н., Рябова А.В., Стрёмовский О.А., Прошкина Г.М., Деев С.М. // *Биохимия*. 2014. Т. 79. № 12. С. 1700–1706.
40. Mironova K.E., Khochenkov D.A., Generalova A.N., Rocheva V.V., Sholina N.V., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Khaydukov E.V. // *Nanoscale*. 2017. V. 9. № 39. P. 14921–14928.
41. Deyev S., Proshkina G., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Eidelstein G., Avishai G., Kotlyar A. // *Bioconjug. Chem.* 2017. V. 28. № 10. P. 2569–2574.
42. Proshkina G., Deyev S., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Cohen R., Katrivas L., Kotlyar A.B. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11. № 38. P. 34645–34651.
43. Mironova K.E., Khochenkov D.A., Generalova A.N., Rocheva V.V., Sholina N.V., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Khaydukov E.V. // *Nanoscale*. 2017. V. 9. № 39. P. 14921–14928.
44. Waibel R., Alberto R., Willuda J., Finnern R., Schibli R., Stichelberger A., Egli A., Abram U., Mach J.-P., Plückthun A., et al. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 9. P. 897–901.
45. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., De Pasquale C., Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., et al. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 4. P. 1595–1605.
46. Schmidt M.M., Wittrup K.D. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 10. P. 2861–2871.
47. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M., Garousi J., Chernov V., Bragina O., Orlova A., et al. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 9405.
48. Vorobyeva A., Schulga A., Rinne S.S., Günther T., Orlova A., Deyev S., Tolmachev V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 12. P. 3047.
49. Vorobyeva A., Bragina O., Altai M., Mitran B., Orlova A., Shulga A., Proshkina G., Chernov V., Tolmachev V., Deyev S. // *Contrast Media Mol. Imaging*. 2018. V. 2018. P. 6930425.
50. Baird R., Omlin A., Kiemle-Kallee J., Fiedler U., Zitt C., Feurstein D., Herbst J., Dawson K., vom Baur E., Stumpp M., et al. // *Cancer Res.* 2018. V. 78. № 4 Suppl. OT1–03–02.
51. Azaro A., Rodon J., Middleton M.R., Baird R.D., Herrmann R., Fiedler U., Haunschild J., Häuptle M., Hermann F.J., Schreiner S., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2018. V. 36. № 15_suppl. P. 2520–2520.
52. Kiemle-Kallee J., Fiedler U., Dawson K.M., Haunschild J., Dietschy S., Stumpp M.T., Hermann F., Harstrick A. // *Cancer Res.* 2018. V. 78. № 13 Suppl. CT1.
53. Knop S., Goldschmidt H., Raab M.S., Szarejko M., Jurzyszyn A., Bringham S., Gamberi B., Vacca A., Acosta J., Lemaillet G., et al. // *Blood*. 2018. V. 132 Supplement 1. P. 1980.
54. Smithwick E., Stewart M.W. // *Antiinflamm. Antiallergy. Agents Med. Chem.* 2017. V. 16. № 999. P. 33–45.
55. Shapira A., Benhar I. // *Toxins (Basel)*. 2010. V. 2. № 11. P. 2519–2583.
56. Weldon J.E., Pastan I. // *FEBS J.* 2011. V. 278. № 23. P. 4683–4700.
57. Martin-Killias P., Stefan N., Rothschild S., Pluckthun A., Zangemeister-Wittke U. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 1. P. 100–110.
58. Shilova O.N., Proshkina G.M., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 3(26). P. 126–133.
59. Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., Shilova O., Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. // *J. Control. Release*. 2016. V. 233. P. 48–56.
60. Mazor R., King E.M., Pastan I. // *Am. J. Pathol.* 2018. V. 188. № 8. P. 1736–1743.

61. Прошкина Г.М., Киселева Д.В., Шилова О.Н., Рябова А.В., Шпрамова Е.И., Стрёмовский О.А., Деев С.М. // Молекуляр. биология. 2017. Т. 51. № 6. С. 997–1007.
62. Sokolova E.A., Shilova O.N., Kiseleva D.V., Schulga A.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 10. P. 2399.
63. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A. // *CA Cancer J. Clin.* 2012. V. 61. № 4. P. 250–281.
64. Chilakamarthi U., Giribabu L. // *Chem. Rec.* 2017. V. 17. № 8. P. 775–802.
65. Mew D., Wat C.K., Towers G.H., Levy J.G. // *J. Immunol.* 1983. V. 130. № 3. P. 1473–1477.
66. You H., Yoon H.-E., Jeong P.-H., Ko H., Yoon J.-H., Kim Y.-C. // *Bioorg. Med. Chem.* 2015. V. 23. № 7. P. 1453–1462.
67. Yoo J.-O., Ha K.-S. // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2012. V. 295. P. 139–174.
68. Staneloudi C., Smith K.A., Hudson R., Malatesti N., Savoie H., Boyle R.W., Greenman J. // *Immunology.* 2007. V. 120. № 4. P. 512–517.
69. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 1. P. 95–99.
70. Sarkisyan K.S., Zlobovskaya O.A., Gorbachev D.A., Bozhanova N.G., Sharonov G.V., Staroverov D.B., Egorov E.S., Ryabova A.V., Solntsev K.M., Mishin A.S., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. P. e0145287.
71. Shu X., Lev-ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Michael W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 4. P. e1001041.
72. Makhijani K., To T.L., Ruiz-González R., Lafaye C., Royant A., Shu X. // *Cell Chem. Biol.* 2017. V. 24. № 1. P. 110–119.
73. Ryumina A.P., Serebrovskaya E.O., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Kuznetsova M.M., Turchin I.V., Ignatova N.I., Klementieva N.V., Fradkov A.F., Shakhov B.E., et al. // *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 2013. V. 1830. № 11. P. 5059–5067.
74. Lin J.Y., Sann S.B., Zhou K., Nabavi S., Proulx C.D., Malinow R., Jin Y., Tsien R.Y. // *Neuron.* 2013. V. 79. № 2. P. 241–253.
75. Souslova E.A., Mironova K.E., Deyev S.M. // *J. Biophotonics.* 2017. V. 10. № 3. P. 338–352.
76. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics.* 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
77. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Biochimie.* 2015. V. 118. P. 116–122.
78. Kuzichkina E.O., Shilova O.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 4(39). C. 87–95.
79. Shilova O.N., Shilov E.S., Deyev S.M. // *Cytom. Part A.* 2017. V. 91. № 9. P. 917–925.
80. Greish K. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 624. P. 25–37.
81. Shilova O.N., Shilov E.S., Lieber A., Deyev S.M. // *J. Control. Release.* 2018. V. 286. P. 125–136.
82. Nazarenus M., Zhang Q., Soliman M.G., Del Pino P., Pelaz B., Carregal-Romero S., Rejman J., Rothen-Rutishauser B., Cliff M.J.D., Zellner R., et al. // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2014. V. 5. P. 1477–1490.
83. Carter T., Mulholland P., Chester K. // *Immunotherapy.* 2016. V. 8. № 8. P. 941–958.
84. Guryev E.L., Shilyagina N.Y., Kostyuk A.B., Sencha L.M., Balalaeva I.V., Vodenev V.A., Kutova O.M., Lyubeshkin A.V., Yakubovskaya R.I., Pankratov A.A., et al. // *Toxicol. Sci.* 2019. V. 170. № 1. P. 123–132.
85. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodenev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.
86. Li D.-L., Tan J.-E., Tian Y., Huang S., Sun P.-H., Wang M., Han Y.-J., Li H.-S., Wu H.-B., Zhang X.-M., et al. // *Biomaterials.* 2017. V. 147. P. 86–98.
87. Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalisman Y., Kotlyar A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
88. Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 20. P. 17437–17447.
89. Shipunova V.O., Kotelnikova P.A., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Novikov I.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *J. Magn. Magn. Mater.* 2019. V. 469. P. 450–455.
90. Russell S.J., Peng K.-W., Bell J.C. // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 30. № 7. P. 658–670.
91. Friedrich K., Hanauer J.R., Prüfer S., Münch R.C., Völker I., Filippis C., Jost C., Hanschmann K.-M., Cattaneo R., Peng K.-W., et al. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 4. P. 849.
92. Hanauer J.R., Gottschlich L., Riehl D., Rusch T., Koch V., Friedrich K., Hutzler S., Prüfer S., Friedel T., Hanschmann K.-M., et al. // *Mol. Ther. Oncolytics.* 2016. V. 3. P. 16003.
93. Münch R.C., Janicki H., Völker I., Rasbach A., Hallek M., Büning H., Buchholz C.J. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 1. P. 109–118.
94. Hagen S., Baumann T., Wagner H.J., Morath V., Kaufmann B., Fischer A., Bergmann S., Schindler P., Arndt K.M., Müller K.M. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 3759.
95. Wilkins O., Keeler A.M., Flotte T.R. // *Hum. Gene Ther. Methods.* 2017. V. 28. № 2. P. 61–66.
96. Benmebarek M.-R., Karches C.H., Cadilha B.L., Lesch S., Endres S., Kobold S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 6. P. 1283.
97. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2014. V. 371. № 16. P. 1507–1517.
98. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Kassim S.H., Somerville R.P.T., Carpenter R.O., Stetler-Stevenson M., Yang J.C., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2015. V. 33. № 6. P. 540–549.
99. Hammill J.A., VanSeggelen H., Helsen C.W., Denisova G.F., Eveleigh C., Tantalos D.G.M., Bassett J.D., Bramson J.L. // *J. Immunother. Cancer.* 2015. V. 3. P. 55.
100. Siegler E., Li S., Kim Y.J., Wang P. // *Hum. Gene Ther.* 2017. V. 28. № 9. P. 726–736.
101. Farag S.S., Caligiuri M.A. // *Blood Rev.* 2006. V. 20. № 3. P. 123–137.
102. Yoon S.R., Lee Y.S., Yang S.H., Ahn K.H., Lee J.-H., Lee J.-H., Kim D.Y., Kang Y.A., Jeon M., Seol M., et al. // *Bone Marrow Transplant.* 2010. V. 45. № 6. P. 1038–1046.
103. Miller J.S., Soignier Y., Panoskaltis-Mortari A., McNearney S.A., Yun G.H., Fautsch S.K., McKenna D., Le C., Defor T.E., Burns L.J., et al. // *Blood.* 2005. V. 105. № 8. P. 3051–3057.
104. Rubnitz J.E., Inaba H., Ribeiro R.C., Pounds S., Rooney B., Bell T., Pui C.-H., Leung W. // *J. Clin. Oncol.* 2010. V. 28. № 6. P. 955–959.
105. Arai S., Meagher R., Swearingen M., Myint H., Rich E., Martinson J., Klingemann H. // *Cytotherapy.* 2008. V. 10. № 6. P. 625–632.
106. Tonn T., Schwabe D., Klingemann H.G., Becker S., Esser R., Koehl U., Suttrop M., Seifried E., Ottmann O.G., Bug G. // *Cytotherapy.* 2013. V. 15. № 12. P. 1563–1570.
107. Rezvani K., Rouce R., Liu E., Shpall E. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. № 8. P. 1769–1781.