

УДК 616-006.6-073.916

[https://doi.org: 10.20538/1682-0363-2019-3-125-133](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-125-133)

Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований

Брагина О.Д.¹, Чернов В.И.^{1,2}, Зельчан Р.В.¹,
Синилкин И.Г.¹, Медведева А.А.¹, Ларькина М.С.³

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

³ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

В настоящем обзоре обсуждается относительно новый класс направленных адресных молекул, активно исследующийся в отношении радионуклидной диагностики и лечения злокачественных образований. Используемые до настоящего времени полноразмерные антитела обладают неоптимальными фармакологическими свойствами, медленным распределением в организме, плохим проникновением в ткани, выведением почками и высокой иммуногенностью, что существенно затрудняет их применение в клинической практике. В течение последнего десятилетия большую популярность приобретают таргетные молекулы, получившие название «альтернативные каркасные белки» (АКБ) или «скаффолды» и отвечающие всем требованиям для оптимальной доставки радионуклида к опухолевым клеткам. Обычно АКБ имеют меньшие размеры по сравнению с антителом, но большие, чем пептиды, и характеризуются высокой аффинностью и оптимальными биохимическими, биофизическими, биологическими и экономическими характеристиками. Преимуществами таких белков являются их стабильная структура, хорошее проникновение в ткани, возможность дополнительной функционализации и экспрессия в бактериальной системе, обеспечивающая низкую стоимость производства.

Результаты проведенных к настоящему моменту доклинических и клинических исследований для диагностики злокачественных образований с использованием таких представителей АКБ, как аффибоди, аднектин, дарпины и пр., продемонстрировали высокую специфичность, аффинность, хорошую переносимость и низкую иммуногенность используемых препаратов.

Ключевые слова: альтернативные каркасные белки, скаффолд, радионуклидная диагностика, молекулярные мишени.

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

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования радиофармацевтического препарата на основе меченых ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией Her-2/neu». Шифр «2017-14-N08-0060». Государственный контракт № 14.N08.11.0163 от 31.08.2017.

✉ Брагина Ольга Дмитриевна, e-mail: bragina_od@mail.ru.

Для цитирования: Брагина О.Д., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Ларкина М.С. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (3): 125–133. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-125-133>.

УДК 616-006.6-073.916

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-125-133>

Alternative scaffolds in radionuclide diagnosis of malignancies

Bragina O.D.¹, Chernov V.I.^{1,2}, Zeltchan R.V.¹, Sinilkin I.G.¹, Medvedeva A.A.¹, Larkina M.S.³

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Science 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

² National Research Tomsk Polytechnic University 30, Lenina Av., 634050, Tomsk, Russian Federation

³ Siberian State Medical University (SSMU) 2, Moscow Trakt, 634050, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

This review discusses a relatively new class of targeted molecules that is being actively studied for radionuclide diagnosis and treatment of malignancies. The full-size antibodies used so far have non-optimal pharmacological properties, slow distribution in the body, poor penetration into the tissue and kidney excretion, and high immunogenicity, which significantly complicates their use in clinical practice. Over the past decade, a new class of targeted molecules, called “non-immunoglobulin scaffolds” have become popular; they have all the requirements for optimal delivery of a radionuclide to tumor cells. Scaffolds usually are smaller in size in comparison with antibodies, but they are larger than peptides, and are characterized by high affinity and optimal biochemical, biophysical, biological, and economic features. The advantages of such proteins are their stable structure, good penetration into tissues, the possibility of additional functionalization and expression in the bacterial system, which ensures low production costs.

The results of preclinical and clinical studies for diagnosis of malignancies using such proteins as affibody, adnectin, DARPin, etc., have demonstrated their high specificity, affinity, good tolerance and low immunogenicity.

Key words: alternative proteins, scaffold, radionuclide diagnosis, molecular targets.

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

Source of financing. The study was supported by the Federal target program “Development of pharmaceutical and medical industries of the Russian Federation up to 2020 and further” on the topic “Preclinical trials of the radiopharmaceutical based on ^{99m}Tc-labeled recombinant target molecules for radionuclide diagnosis of cancer with overexpression of Her-2/neu”. Code “2017-14-N08-0060”. State contract No. 14.N08.11.0163 of 31.08.2017.

For citation: Bragina O.D., Chernov V.I., Zeltchan R.V., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Larkina M.S. Alternative scaffolds in radionuclide diagnosis of malignancies. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (3): 125–133. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-125-133>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для диагностики злокачественных образований все большее распространение получают таргетные радионуклидные методы,

обладающие высокой специфичностью к различным молекулярным мишеням, расположенным на поверхности мембран опухолевых клеток и позволяющим визуализировать очаги различных

размеров (основной опухолевый узел и метастатические очаги) [1]. До недавнего времени в качестве основного компонента радиоиммуноконъюгата использовались моноклональные антитела (мкАТ) [2]. Однако результаты исследований с применением мкАТ не оправдали возложенных на них ожиданий и выявили ряд особенностей, существенно ограничивающих их использование в клинической практике. При тщательном изучении оказалось, что мкАТ обладают значительно сниженной эффективностью взаимодействия с антигеном, неоптимальными фармакологическими свойствами, медленным распределением в организме, плохим проникновением в ткани и выведением почками (из-за высокой молекулярной массы – 150 кДа) [3]. К наиболее существенному недостатку относится высокая иммуногенность применяемых мышинных мкАТ, что в ответ на их введение приводит к образованию нейтрализующих антител и, соответственно, к возникновению гипериммунных реакций и снижению эффективности лечения. Стало очевидным, что для клинического применения необходимо кардинальное видоизменение мкАТ, включающее коррекцию размеров, аффинности, валентности и пр. [4].

В связи с поиском новых эффективных агентов, способных нацеливаться на специфические мишени, началось интенсивное изучение молекулярных конструкций, альтернативных связывающим доменам антител и имеющих ряд обязательных характеристик, таких как связывание исключительно с «таргетным» антигеном для специфической локализации, отсутствие иммуногенности, стабильность и возможность быстрой химической модификации для проведения процессов мечения [5]. Помимо этого, оптимальной функцией для радионуклидной визуализации являются скорость связывания препарата с мишенью и быстрое удаление несвязавшихся молекул из организма пациента для достижения высокого качества визуализации опухоли и сокращения временного промежутка между инъекцией и началом исследования [6].

В течение последнего десятилетия большую популярность приобретает новый класс таргетных молекул, получивших название «альтернативные каркасные белки» (АКБ) или «скаффолды» (scaffolds) и отвечающих всем требованиям для оптимальной доставки радионуклида к опухолевым клеткам [7]. Впервые термин «скаффолд» был введен профессором Плюктуном и соавт. для обозначения белкового каркаса или остова, состоящего из видоизмененных аминокислотных остатков или небольших последовательностей и

придающего различным вариантам белка разные функции, чаще возможность эффективного связывания со специфическими мишенями [8].

Обычно АКБ имеют меньшие размеры по сравнению с антителом, но большие, чем пептиды, и характеризуются высокой аффинностью и оптимальными биохимическими, биофизическими, биологическими и экономическими характеристиками. Преимуществами таких белков являются их стабильная структура, хорошее проникновение в ткани, возможность дополнительной функционализации и экспрессия в бактериальной системе, обеспечивающая низкую стоимость производства [9]. При этом основными требованиями к данной категории полипептидов являются наличие компактной и относительно жесткой пространственной структуры-каркаса, перспективы последующих белково-инженерных манипуляций и возможности получения гибридов с другими функциональными модулями. Целью стратегии с использованием высокоаффинных структур для связывания с мишенью является идентификация молекул с 3D-формой, которые будут совпадать со специфичным определенной опухоли антигеном [10]. Обычно АКБ состоят из выбранной белковой структуры/каркаса с подходящими свойствами для топографических вариаций. В данном случае важным моментом является то, что белковая структура остается стабильной под влиянием широкого спектра используемых растворителей и методов воздействия. Обычно для этого, с одной стороны, требуется небольшой размер молекул для облегчения производства, с другой – для увеличения разнообразия манипуляций для создания многомерных и биспецифических конструкций или изменения размера [11].

РАЗНОВИДНОСТИ АКБ И ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ИХ СИНТЕЗА

Альтернативные каркасные белки можно классифицировать по различным критериям, таким как размер, способ синтеза, происхождение, и биологическим функциям. Одним из основных критериев, однако, является их разделение в соответствии с элементами структуры, что объясняется возможностью передачи их биологических свойств также и новым производным (рис.) [12, 13]. Первый класс представляют собой соединения доменного строения (domain-sized compounds) (6–20 кДа), такие как аффибоды (Affibody, Inc.), альбумин-связывающие домены, имеющие родство с протеином (ADAPTs), аффилины (Scil Proteins GmbH), антикарины (Pierris, Inc.), атримеры (Anaphore, Inc.), дарпины

(Dyax, Inc., Shire Inc.), Fn3 скаффолды (Molecular Partners, Inc.), финомерные платформы (Janssen), домены типа ингибитора кунитца или пронектин (Protelica), последовательности на основе FN3 белка (Protelica, Inc.). Ко второму классу

относятся пептиды с закрепленной структурой (constrained peptides) (2–4 кДа), такие как вимеры (Avimers [Avidia, Inc.]), бициклический пептиды (Bicycle Therapeutics, Inc.) и цистеин-содержащие пептиды [14].

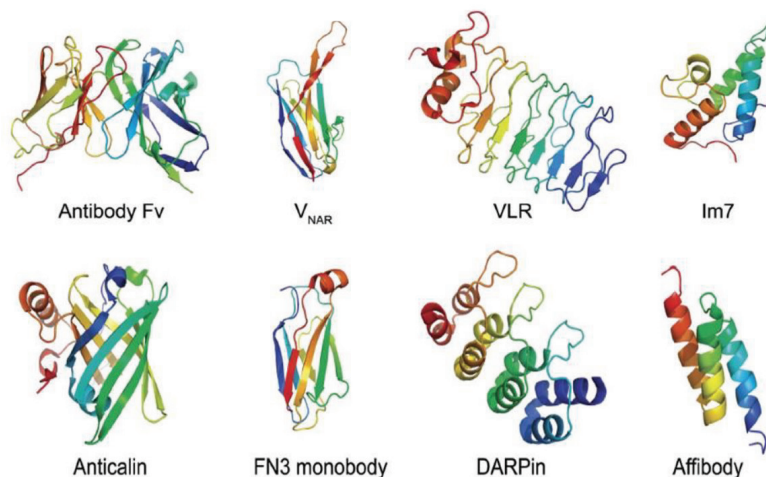


Рисунок. Схематичное изображение различных альтернативных каркасных белков
Figure. Schematic representation of scaffolds

Для обоих классов альтернативных каркасных белков характерен синтез с использованием комбинаторной библиотеки, которая включает набор генов АКБ со случайной последовательностью нуклеотидов в определенных участках, кодирующих варьируемые аминокислотные остатки [15]. Комбинаторная библиотека содержит миллиарды молекул, лежащих в основе постоянной белковой матрицы, разделенной на несколько отличающихся друг от друга областей. Обычно библиотеки смешиваются с иммобилизованным в процессе селекции антигеном, после чего путем вымывания «выбираются» только связавшиеся с ним молекулы, обладающие хорошей аффинностью [16]. Для создания высокоспецифичной молекулы с заданными характеристиками к этапу селекции обычно добавляют дополнительные этапы, удаляя при этом молекулы, связавшиеся одновременно как с нежелательными, так и с желательными мишенями [17]. На следующем этапе проводят идентификацию полученных клонов и изучение свойств полученного белка [18].

Для отбора с помощью комбинаторной библиотеки белков, обладающих заданными связывающими свойствами, используется несколько различных стратегий или систем белковой селекции. Поскольку методы определения последовательности ДНК являются более доступными, все используемые в настоящее время системы основываются на связи между генотипом (кодирующей

последовательностью) и фенотипом (связывающей активностью) белка, что позволяет легко идентифицировать и амплифицировать отобранные полипептиды при помощи кодирующих их ДНК или РНК [19].

Различные системы селекции обладают своими преимуществами и ограничениями. Их выбор в каждом конкретном случае основывается на различных факторах, в частности доступности и свойствах целевого лиганда [20]. Можно выделить три основных типа систем селекции: системы клеточного и бесклеточного дисплея и системы селекции *in vivo*. При использовании клеточного дисплея в клетки организма-хозяина различными способами вводят ДНК, представляющую собой соответствующую комбинаторную библиотеку, в результате чего связывающие белки экспонируются на поверхности клеток или фаговых частиц (фаговый дисплей) либо экспрессируются в какой-либо обособленной области клетки. Характерной чертой бесклеточных систем является использование транскрипции и трансляции *in vitro* для конструирования и скрининга комбинаторных библиотек [21]. При помощи данного способа могут быть получены библиотеки размером до 10^{13} вариантов, причем на стадии амплификации возможно проведение мутагенеза *in vitro*, обеспечивающего направленную эволюцию в каждом раунде селекции [22]. Существуют также системы селекции *in vivo*, в которых

целевой лиганд экспрессируется совместно с вариантами связывающих белков из библиотеки, таким образом процесс селекции не зависит от доступности целевого лиганда [23].

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ КАРКАСНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ РАДИО-НУКЛИДНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ

Аффибоды. К наиболее изученным представителям АКБ относятся аффибоды, являющиеся первыми скаффолдами, использованными для радионуклидной визуализации (таблица) [14]. В настоящее время закончены I/II фазы клинических исследований по изучению накопления радиоактивного фармацевтического препарата на основе молекулы АВУ-025, меченной ^{111}In и ^{68}Ga , для диагностики с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) метастатического Her2/neu – позитивного рака молочной железы. При клинической апробации были продемонстрированы хорошая переносимость и отсутствие иммунных реакций на повторное введение препарата. Сравнение с результатами иммуногистохимического анализа биопсийного материала показало, что измерение максимального захвата через 2–4 ч после введения препарата является значимой характеристикой, позволяющей дифференцировать метастатическое поражение с экспрессией Her2/neu 2^+ и 3^+ . Также для выделения высокой и низкой экспрессии Her2/neu может использоваться референсное значение опухоль–селезенка при проведении как ПЭТ, так и ОФЭКТ и тем самым независимо от внешних аппаратных калибровок [24–26].

В настоящее время ведутся исследования в отношении молекул аффибоды ZIGF1R:4551 и Z08698, тропных к инсулиноподобному фактору роста 1 (IGF-1R) и эпидермальному фактору роста Her3 соответственно. Гиперэкспрессия данных молекулярных маркеров, как известно, может ассоциироваться с резистентностью к трастузумабу у больных раком молочной железы, а их выявление позволит ее предсказывать и корректировать планируемое лечение. Также экспрессия данных маркеров имеет важное значение и при других злокачественных образованиях, например, раке простаты и яичников. Меченная $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ZIGF1R:4551 и меченная ^{68}Ga Z08698 молекулы на доклинических исследованиях продемонстрировали высокую аккумуляцию в опухолевых клетках и распределение соединения в

опухолевой ткани ксенографта, пропорциональные уровню экспрессии Her3 [27].

Также проводятся доклинические этапы по изучению молекул аффибоды ZEGFR:2377 к эпидермальному фактору роста EGFR1 для диагностики немелкоклеточного рака легких и опухолей головы и шеи, ZCAIX:2 к углеродной ангидразе IX для выявления радиорезистентных гипоксических опухолей и рака почки, а также Z09591 к рецептору фактора роста тромбоцитов Я [28, 29].

Дарпины. Представляют собой естественные анкириновые повторы пептида, состоящего из повторяющихся доменов длиной 33 а.о. и обладающего стабильной структурой из Я-поворота и двух α -спиралей. Обычно белки представлены 4–6 модулями с суммарной молекулярной массой от 14 до 21 кДа (молекулярная масса каждого 3,5 кДа) [30, 31].

Одно из первых доклинических исследований с использованием дарпина G3 было проведено Goldstein с соавт., описывающего мечение данной молекулы ^{125}I и ^{111}In для ОФЭКТ диагностики опухолей с гиперэкспрессией Her2/neu. По результатам этого исследования в обоих случаях отмечался высокий захват препарата опухолевой тканью на моделях BT-474 ксенографтов через 4 ч после введения. Однако более низкое поглощение нормальными тканями при использовании меченного ^{111}In компонента привело к увеличению соотношения опухоль–фон по сравнению с аналогом, меченным ^{125}I [32].

Результаты исследования Vorobyeva с соавт. с применением молекул дарпина 9_29, меченных $^{99\text{m}}\text{Tc}$ и ^{125}I , в обоих случаях – *in vitro* и *in vivo* – продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность соединений к рецепторам Her2/neu [33, 34].

ADAPT. Представляют собой 46-аминокислотный каркас альбуминсвязывающего домена стрептококкового белка G с молекулярной массой 5,2 кДа. Нацеленный на рецептор Her2 ADAPT6 был выбран из-за его высокоаффинного связывания и быстрого выведения из кровотока в связи с низким связыванием с альбумином. Соединения на основе меченного $^{111}\text{In}/^{68}\text{Ga}$ ADAPT6 на этапе доклинических исследований продемонстрировали высокой захват опухолевой тканью SCOV3 ксенографтов через 1 ч после введения с четкой дифференцировкой по данным компьютерной томографии между высоким и низким уровнями экспрессии молекулярного маркера [35]. Последующие исследования продемонстрировали, что специфичность ADAPT6 значительно улучшается путем химической

модификации и добавлении N-терминального конца. При использовании оптимизированного варианта Cu^{59} -(HE)3DANS-ADAPT6, меченного ^{111}In , соотношение опухоль–кровь через 4 ч после введения составило 277 ± 35 [36].

Аднектин. Протеин, представляющий собой 10-й домен фибронектина III типа FN3 молекулярной массой 10 кДа и направленный на CD20 для ПЭТ-визуализации В-клеточных лимфом. Данная молекула обладает термостабильностью, высокой растворимостью и имеет пространственную структуру. *In vivo* проводилось изучение соединений на основе меченной ^{64}Cu молекулы FN3_{CD20} (^{64}Cu -DOTA-FN3CD20) на моделях опухолевого роста трансгенных животных, которое продемонстрировало высокое удельное накопление в селезенке и органах, экспрессирующих CD20 через 1 ч после введения препарата. У нетрансгенных мышей, несущих опухоли человека, экспрессирующих CD20, ис-

пользование соединения ^{64}Cu -FN3CD20 продемонстрировало высокий специфический захват опухолевой тканью с низкой аккумуляцией здоровыми тканями через 4 ч после инъекции [37]. Относительно недавно началось изучение аднектина к поверхностному рецептору PD-L1, участвующему в иммунной отмене. По результатам *in vivo* исследований на моделях опухолевого поражения у животных меченной ^{18}F молекулы BMS-986192 (^{18}F -BMS-986192) при проведении ПЭТ опухолевый узел визуализировался через 2 ч после инъекции. При проведении исследования Synopolgus специфическое связывание ^{18}F -BMS-986192 отмечалось в селезенке с быстрым выведением из кровотока через почки и мочевой пузырь. В настоящее время проводятся одноцентровые клинические испытания данного соединения CheckMate 511 (NCT02714218 / EudraCT 2015-004920-67) у пациентов с отдаленными метастазами при меланоме [38].

Таблица
Table

Разновидности меченных АКБ, используемых в течение последних 5 лет для направленной радионуклидной визуализации онкологических заболеваний					
Varieties of labeled scaffolds used for radionuclide imaging of oncological diseases over the last 5 years					
Тип скаффолда Scaffold type	Исходный протеин Original protein	Мишень Target	Основной компонент Principal component	Изотоп Isotope	Стадия исследования Stage of the research
Аднектин Adnectin	10-й домен человеческого FN3 10 th human FN3 domain	CD20	FN3 _{CD20}	^{64}Cu	Доклиническая Preclinical trials
		PD-L1	BMS-986192	^{18}F	Доклиническая Preclinical trials
Аффибоди Affibody	Z-домен стафилококкового протеина A Z domain of staphylococcal protein A	HER2	ABY-025	^{68}Ga	Клиническая Clinical trials
			ZHER2:V2	^{111}In	Клиническая Clinical trials
				^{188}Re	Доклиническая Preclinical trials
		HER3	Z08698	^{111}In	Доклиническая Preclinical trials
				^{68}Ga	Доклиническая Preclinical trials
			Z08699	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Доклиническая Preclinical trials
		IGF-1R	ZIGFR:2377	^{68}Ga	Доклиническая Preclinical trials
				$^{55/57}\text{Co}$	Доклиническая Preclinical trials
		CAIX	ZCAIX:2	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Доклиническая Preclinical trials
			ZCAIX:4	^{125}I	Доклиническая Preclinical trials
PDGFR α	Z09591	^{68}Ga	Доклиническая Preclinical trials		
PD-L1	Z _{PD-L1}	^{18}F	Доклиническая Preclinical trials		

Окончание таблицы
End of table

Тип скаффолда Scaffold type	Исходный протеин Original protein	Мишень Target	Основной компонент Principal component	Изотоп Isotope	Стадия исследования Stage of the research
ADAPT	Альбуминсвязывающий домен протеина стрептококка G Albumin-binding domain of streptococcal protein G	HER2	C-(HE) ₃ -ADAPT6	⁶⁸ Ga	Доклиническая Preclinical trials
				¹¹¹ In	Доклиническая Preclinical trials
			Cys ⁵⁹ -(HE)3DANS-ADAPT6	¹¹¹ In	Доклиническая Preclinical trials
				¹²⁵ I	Доклиническая Preclinical trials
			Cys ² -(HE)3DANS-ADAPT6	¹¹¹ In	Доклиническая Preclinical trials
				¹²⁵ I	Доклиническая Preclinical trials
Дарпин DARPin	Естественные анкириновые повторы Natural ankyrin repeats	HER2	G3	¹¹¹ In	Доклиническая Preclinical trials
				¹²⁵ I	Доклиническая Preclinical trials
			9_29	^{99m} Tc	Доклиническая Preclinical trials
Knottin	Ингибитор цистеинового узла Inhibitor cysteine knot	$\alpha_v\gamma_6$	S ₀ 2	⁶⁴ Cu	Доклиническая Preclinical trials
				¹¹¹ In	Доклиническая Preclinical trials
		$\alpha_v\gamma_6$	7c	¹⁸ F	Доклиническая Preclinical trials

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование альтернативных каркасных белков для таргетной радионуклидной диагностики злокачественных образований представляет огромный интерес и является актуальным и перспективным направлением. Несомненно, преимуществами данного рода соединений являются их небольшие размеры, высокие аффинность и специфичность, стабильная структура, хорошее проникновение в ткани, хорошая переносимость, а также относительно низкая стоимость производства. Несомненно, использование в клинической практике соединений на основе меченных изотопами скаффолдов позволит проводить определение распространенности опухолевого процесса как основного опухолевого узла, так и регионарных узлов и отдаленных органов и тканей, часто имеющих различия в экспрессии маркеров, без лишних инвазивных вмешательств, тем самым повышая точность диагностического этапа и корректируя тактику лечения пациентов, а также выполнять динамическую оценку состояния опухоли на фоне проводимого лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Чернов В.И., Медведева А.А., Синилкин И.Г., Зельчан Р.В., Брагина О.Д., Чойнзон Е.А. Ядерная медицина в диагностике и адресной терапии злокачественных ново-

образований. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 220–231. [Chernov V.I., Medvedeva A.A., Sinilkin I.G., Zelchan R.V., Bragina O.D., Choynzonov E.L. Nuclear medicine as a tool for diagnosis and targeted cancer therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 220–231 (in Russ.).]

- Tolmachev V., Orlova A., Andersson K. Methods for radiolabelling of monoclonal antibodies. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1060: 309–330. DOI: 10.1007/978-1-62703-586-6_16.
- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радиоиммунотерапия: современное состояние проблемы. *Вопросы онкологии*. 2016; 62 (1): 24–30. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Zelchan R.V. Radioimmunotherapy: Current state of the problem. *Oncological Questions*. 2016; 62 (1): 24–30 (in Russ.).]
- Nicholes N., Date A., Beaujean P., Hauk P, Kanwar M, Ostermeier M. Modular protein switches derived from antibody mimetic proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2016; 29: 77–85. DOI: 10.1093/protein/gzv062.
- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Тицкая А.А., Зельчан Р.В. Радиоиммунотерапия в лечении злокачественных образований. *Сибирский онкологический журнал*. 2016; 15 (2): 101–106. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Titskaya A.A., Zelchan R.V. Radioimmunotherapy in the treatment of malignancies. *Siberian Journal of Oncology*. 2016; 15 (2): 101–106 (in Russ.).] DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-2-101-106.
- Stumpp M., Binz H., Amstutz P. DARPin: A new generation of protein therapeutics. *Drug Discovery Today*. 2008; 13 (15–16): 695–701. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.04.013.

7. Vazquez-Lombardi R., Giang Phan T., Zimmermann C., Lowe D., Jermutus L., Christ D. Challenges and opportunities for non-antibody scaffold drugs. *Drug Discovery Today*. 2015; 20 (10): 1271–1283. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.09.004.
8. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015; 55: 489–511. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654.
9. Azhar A., Ahmad E., Zia Q., Rauf M.A., Owais M., Ashraf G.M. Recent advances in the development of novel protein scaffolds based therapeutics. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 102: 630–641. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.045.
10. Hausamann S., Vogel M., Kremer J.A. Designed ankyrin repeat proteins: A new approach to mimic complex antigens for diagnostic purposes? *PLoS One*. 2013; 8: 1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0060688.
11. Moody P., Chudasama V., Nathani R.I., Maruani A., Martin S., Smith M.B., Caddick S. A rapid, site-selective and efficient route to the dual modification of DARPins. *Chem. Commun. (Camb.)*. 2014; 50 (38): 4898–4900. DOI: 10.1039/c4cc00053f.
12. Kramer L., Renko M., Završnik J., Turk D., Seeger M.A., Vasiljeva O., Grütter M.G., Turk V., Turk B. Non-invasive in vivo imaging of tumour-associated cathepsin B by a highly selective inhibitory DARPin. *Theranostics*. 2017; 7 (11): 2806–2821. DOI: 10.7150/thno.19081.
13. Houlihan G., Gatti-Lafronconi P., Lowe D., Hollfelder F. Directed evolution of anti-HER2 DARPins by SNAP display reveals stability/function trade-offs in the selection process. *Protein Eng. Des. Sel.* 2015; 28 (9): 269–279. DOI: 10.1093/protein/gzv029.
14. Krasniqi A., D'Huyvetter M., Devoogdt N., Frejd F. Y., Sorensen J., Orlova A., Keyaerts M., Tolmachev V. Same-Day Imaging Using Small Proteins: Clinical Experience and Translational Prospects in Oncology. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018; 59 (6): 885–891. DOI: 10.2967/jnumed.117.199901.
15. Boersma Y., Pluckthun A. DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011; 22 (6): 849–857. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.06.004.
16. Binz H., Stumpp M., Forrer P., Amstutz P., Plückthun A. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J. Mol. Biol.* 2003; 332 (2): 489–503. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00896-9.
17. Buday L., Tompa P. Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *The FEBS Journal*. 2010; 277 (21): 4348–4355. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07864.x.
18. Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Альтернативные каркасные белки. *Биоорганическая химия*. 2011; 37 (5): 581–591. [Petrovskaya L.E., Shingarova L.N., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Alternative Scaffold Proteins. *Bioorganic Chemistry*. 2011; 37 (5): 581–591 (in Russ.)].
19. Frejd F.Y., Kim K. Affibody molecules as engineered protein drugs. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017; 49 (3): e306. DOI: 10.1038/emm.2017.35.
20. Good M.C., Zalatan J.G., Lim W.A. Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information. *Science*. 2011; 332 (6030): 680–686. DOI: 10.1126/science.1198701.
21. Simeon R., Chen Z. In vitro-engineered non-antibody protein therapeutics. *Protein Cell*. 2018; 9 (1): 3–14. DOI: 10.1007/s13238-017-0386-6.
22. De Vos J., Devoogdt N., Lahoutte T., Muyldermans S. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013; 13 (8): 1149–1160. DOI: 10.1517/14712598.2013.800478.
23. Miao Z., Levi J., Cheng Z. Protein scaffold-based molecular probes for cancer molecular imaging. *Amino Acids*. 2011; 41 (5): 1037–1047. DOI: 10.1007/s00726-010-0503-9.
24. Sorensen J., Sandberg D., Sandstrom M., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V., Estrøm G., Lubberink M., Garske-Romón U., Carlsson J., Lindman H. First-in-human molecular imaging of HER2 expression in breast cancer metastases using the ¹¹¹In-ABY-025 affibody molecule. *J. Nucl. Med.* 2014; 55 (5): 730–735. DOI: 10.2967/jnumed.113.131243.
25. Sorensen J., Velikyan I., Sandberg D., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V., Orlova A., Sandstrøm M., Lubberink M., Olofsson H., Carlsson J., Lindman H. Measuring HER2-receptor expression in metastatic breast cancer using [⁶⁸Ga]ABY-025 Affibody PET/CT. *Theranostics*. 2016; 6 (2): 262–271. DOI: 10.7150/thno.13502.
26. Sandstrom M., Lindskog K., Velikyan I., Wennborg A., Feldwisch J., Sandberg D., Tolmachev V., Orlova A., Sorensen J., Carlsson J., Lindman H., Lubberink M. Biodistribution and radiation dosimetry of the anti-HER2 Affibody molecule ⁶⁸Ga-ABY-025 in breast cancer patients. *J. Nucl. Med.* 2016; 57 (6): 867–871. DOI: 10.2967/jnumed.115.169342.
27. Nahta R., Yu D., Hung M.C., Hortobagyi G.N., Esteva F.J. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006; 3 (5): 269–280.
28. Garousi J., Honarvar H., Andersson K.G., Mitran B., Orlova A., Buijs J., Löfblom J., Frejd F.Y., Tolmachev V. Comparative evaluation of Affibody molecules for radionuclide imaging of *in vivo* expression of carbonic anhydrase IX. *Mol. Pharm.* 2016; 13 (11): 3676–3687. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00502.
29. Strand J., Varasteh Z., Eriksson O., Abrahamson L., Orlova A., Tolmachev V. Gallium-68-labeled affibody molecule for PET imaging of PDGFR beta expression *in vivo*. *Mol. Pharm.* 2014; 11 (11): 3957–3964. DOI: 10.1021/mp500284t.
30. Hanenberg M., McAfoose J., Kulic L. Amyloid-β peptide-specific DARPins as a novel class of potential therapeutics for Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 2014; 289 (39): 27080–27089. DOI: 10.1074/jbc.M114.564013.

31. Tamaskovic R., Simon M., Stefan N., Schwill M., Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin) from research to therapy. *Methods Enzymol.* 2012; 503: 101–134. DOI: 10.1016/B978-0-12-396962-0.00005-7.
32. Goldstein R., Sosabowski J., Livanos M., Leyton J., Vigor K., Bhavsar G., Nagy-Davidescu G., Rashid M., Miranda E., Yeung J., Tolner B., Plückthun A., Mather S., Meyer T., Chester K. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2015; 42 (2): 288–301. DOI: 10.1007/s00259-014-2940-2.
33. Vorobyeva A., Bragina O., Altai M., Mitran B., Orlova A., Shulga A., Proshkina G., Chernov V., Tolmachev V., Deyev S. Comparative Evaluation of Radioiodine and Technetium-Labeled DARPin 9₂₉ for Radionuclide Molecular Imaging of HER2 Expression in Malignant Tumors. *Contrast Media & Molecular Imaging.* 2018; 2018: 6930425. DOI: 10.1155/2018/6930425.
34. Брагина О.Д., Ларькина М.С., Стасюк Е.С., Чернов В.И., Юсубов М.С.О., Скуридин В.С., Деев С.М., Зельчан Р.В., Булдаков М.А., Подрезова Е.В., Белоусов М.В. Разработка высокоспецифического радиохимического соединения на основе меченных ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her2/neu. *Бюллетень сибирской медицины.* 2017; 16 (3): 25–33. [Bragina O.D., Larkina M.S., Stasyuk E.S., Chernov V.I., Yusubov M.S., Skuridin V.S., Deyev S.M., Zelchan R.V., Buldakov M.A., Podrezova E.V., Belousov M.V. Development of highly specific radiochemical compounds based on ^{99m}Tc-labeled recombinant molecules for targeted imaging of cells overexpressing Her-2/neu. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (3): 25–33 (in Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-25–33.
35. Garousi J., Lindbo S., Nilvebrant J., Estrand M., Buijs J., Sandström M., Honarvar H., Orlova A., Tolmachev V., Hober S. ADAPT, a novel scaffold protein-based probe for radionuclide imaging of molecular targets that are expressed in disseminated cancers. *Cancer Res.* 2015; 75: 4364–4371. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3497.
36. Lindbo S., Garousi J., Mitran B., Altai M., Buijs J., Orlova A., Hober S., Tolmachev V. Radionuclide tumor targeting using ADAPT scaffold proteins: aspects of label positioning and residualizing properties of the label. *J. Nucl. Med.* 2018; 59 (1): 93–99. DOI: 10.2967/jnumed.117.197202.
37. Natarajan A., Hackel B.J., Gambhir S.S. A novel engineered anti-CD20 tracer enables early time PET imaging in a humanized transgenic mouse model of B-cell non-Hodgkins lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19 (24): 6820–6829. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0626.
38. Donnelly D.J., Smith R.A., Morin P., Lipovšek D., Gokemeijer J., Cohen D., Lafont V., Tran T., Cole E.L., Wright M., Kim J., Pena A., Kukral D., Dischino D.D., Chow P., Gan J., Adelakun O., Wang X.T., Cao K., Leung D., Bonacorsi S.J. Jr., Hayes W. Synthesis and biological evaluation of a novel 18F-labeled Adnectin as a PET radioligand for imaging PD-L1 expression. *J. Nucl. Med.* 2018; 59 (3): 529–535. DOI: 10.2967/jnumed.117.199596.

Сведения об авторах

Брагина Ольга Дмитриевна, канд. мед. наук, врач-онколог, мл. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-5281-7758.

Чернов Владимир Иванович, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения радионуклидной диагностики НИИ онкологии, Томский НИМЦ; НИ ТПУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-5524-9546.

Зельчан Роман Владимирович, канд. мед. наук, врач-радиолог, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4568-1781.

Синилкин Иван Геннадьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-6351-6408.

Медведева Анна Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-5840-3625.

Ларькина Мария Сергеевна, канд. фармацевт. наук, доцент, кафедра фармацевтического анализа СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1176-2441.

✉ Брагина Ольга Дмитриевна, e-mail: bragina_od@mail.ru.

Authors information

Bragina Olga D., PhD, Junior Researcher, Nuclear Medicine Department, Oncology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5281-7758.

Chernov Vladimir I., DM, Professor, Head of the Nuclear Medicine Department, Oncology Research Institute, Tomsk NRMC; NR TPU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-5524-9546.

Zelchan Roman V., PhD, Radiologist, Nuclear Medicine Department, Oncology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4568-1781.

Sinilkin Ivan G., PhD, Senior Researcher, Nuclear Medicine Department, Oncology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6351-6408.

Medvedeva Anna A., PhD, Senior Researcher, Nuclear Medicine Department, Oncology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-5840-3625.

Larkina Maria S., PhD, Associate Professor, Pharmaceutical Analysis Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1176-2441.

✉ **Bragina Olga D.**, e-mail: bragina_od@mail.ru.

Received 18.02.2018
Accepted 11.06.2019

Поступила в редакцию 18.02.2018
Подписана в печать 11.06.2019