

СТРАТЕГИИ ЗА ДИЗАЙН НА ЛЕКАРСТВЕНИ ТЕРАПИИ, СЪДЪРЖАЩИ ИНЖЕНЕРНИ ПРОТЕИНИ

Тони Веков¹, Лидия Димова¹, Валентина Белчева², Елица Бечева-Крайчир^{1,2}

¹МБАЛ „Сърце и мозък“ – Плевен

²Медицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора

STRATEGIES FOR THE DESIGN OF DRUG THERAPIES CONTAINING ENGINEERED PROTEINS

Toni Vekov¹, Lidiya Dimova¹, Valentina Belcheva², Elitza Betcheva-Krajcir^{1,2}

¹Heart and Brain Hospital, Pleven

²Department of Molecular Biology, Immunology, and Medical Genetics, Faculty of Medicine, Trakia University, Stara Zagora

РЕЗЮМЕ

Лекарствените терапии, базирани на инженерни протеини, въвеждат нови парадигми в лечението на болестите в края на XX и началото на XXI в. Днес инженерните протеини са в класацията на най-продаваните лекарствени продукти в световен мащаб и се оказват конкуренти, а в някои случаи и значително превъзхождат използваните лекарства, базирани на малки химични молекули. В статията чрез документални методи за анализ на публикувани научни данни от предклинични и клинични изпитвания на инженерни протеини за терапевтични цели са осмислени съвременните дизайни на терапевтичните инженерни протеини от гледна точка на повишен афинитет, специфичност, стабилност, клетъчна пропускливост и фармакокинетика, както и при намалени дози във връзка с възможна нежелана имуногенност. Разгледани са различни стратегии за дизайн на инженерните протеини, представляващи различни структурни модификации:

1. Сайт-специфична мутагенеза;
2. Конюгати антитяло-лекарство;
3. Пегилиране;
4. Гликозилиране;
5. Fc синтез;
6. Синтез на други протеини;
7. Липидиране;
8. Прикрепване на не-PEG-полимери;
9. Свърх зареждане;
10. Изчислителен дизайн.

Ключови думи: инженерни протеини, лекарствени терапии, дизайн на стратегии

ABSTRACT

Drug therapies based on engineered proteins introduced new paradigms in the treatment of diseases in the late 20th and early 21st centuries. Today, engineered proteins are among the best-selling pharmaceuticals worldwide and are proving to be competitors, and in some cases significantly superior, to the drugs based on small chemical molecules. In the article, using documentary methods for analyzing published scientific data from preclinical and clinical trials of engineered proteins for therapeutic purposes, modern designs of therapeutic engineered proteins are considered in terms of increased affinity, specificity, stability, cell permeability and pharmacokinetics, as well as reduced doses in connection with possible unwanted immunogenicity. Different strategies for the design of engineered proteins, representing various structural modifications, are considered:

1. Site-specific mutagenesis;
2. Antibody–drug conjugates;
3. PEGylation;

4. *Glycosylation;*
5. *Fc synthesis;*
6. *Synthesis of other proteins;*
7. *Lipidation;*
8. *Attachment of non-PEG polymers;*
9. *Supercharging;*
10. *Computational design.*

Keywords: *engineered proteins, drug therapies, strategy design*

ВЪВЕДЕНИЕ

Лекарствените терапии, базирани на инженерни протеини, въвеждат нови парадигми в лечението на болестите през последното десетилетие на XX в. Тези лекарствени продукти се оказват конкуренти и в някои случаи значително превъзхождат използваните лекарства, базирани на малки химични молекули. Днес инженерните протеини са в класацията на най-продаваните лекарствени продукти в световен мащаб.

Протеините са най-универсалният клас биологични молекули, действащи като катализатори, сигнални молекули, транспортери, рецептори, скелета за поддържане целостта на клетката и тъканите и много други функции (1).

Следователно като лекарствени продукти инженерните протеини могат да се използват за изпълнение на всяка от тези роли и предлагат няколко предимства пред традиционните химични лекарства. Протеините е по-малко вероятно да причинят странични ефекти чрез намеса в естествените биологични процеси, тъй като те също са еволюирали естествени молекули, които играят много специфични роли. Обикновено протеиновите лекарствени продукти показват висока ефективност и могат да изпълняват по-сложни функции в резултат на пространствената си триизмерна структура.

Въпреки това не трябва да бъдат пренебрегвани предизвикателствата, които трябва да бъдат разрешени, свързани с присъщата чувствителност на протеините към агрегация, разграждане, денатурация и съпътстваща загуба на активност (2). Ненавременното изчистване на организма, неспецифичното разпределение, имуногенността и точността също пораждат редица опасения.

Напредъкът в рационалния дизайн и способността за проектирано въвеждане на химични и структурни модификации (инженерни протеини) са довели до нови стратегии за приложение на протеините като ефикасни и безопасни лекарствени терапии (3).

Класовете лекарствени продукти, които са базирани на инженерни протеини, включват: 1. анти-тела (Ab) - използват се предимно за свързване на целеви антигени, които след това могат да блокират специфични сигнални пътища (напр. nivolumab, pembrolizumab), да индуцират клетъчна апоптоза (напр. obinutuzumab) или да доставят мощни цитотоксични лекарства до туморните клетки (напр. trastuzumab emtansine); 2. ензими - използват се за заместване на дефицитен или липсващ ензим (ензимна заместителна терапия), както и за катализиране на разграждането, разцепването или химичното модифициране на терапевтично значими цели (напр. sacrosidase, pegvaliase); 3. коагулационни фактори - използват се за редица индикации, свързани с кръвене, вкл. хемофилия А и В (напр. eptacog-alfa); 4. протеинови хормони - прилагат се за свързване със специфични рецептори, които след това задействат сигнална каскада и водят до целеви физиологичен резултат (напр. insulin); 5. цитокини - медиират комуникацията между клетките по време на имунните отговори (напр. interferon, interleukin) (4,5).

За да функционират като ефективни терапевтични средства, протеините трябва да имат определени характеристики. Тези желани атрибути варират и са свързани с терапевтичното приложение, което представлява интерес. Ключово съображение е стабилността на протеините както при условия на съхранение, така и *in vivo*. Много протеини са податливи на агрегация, разграждане (напр. чрез дезаминиране, окисление или протеази) и денатурация, което може значително да понижи тяхната терапевтична ефикасност (6). За преодоляване на описаните предизвикателства със стабилността на протеините, се прилагат различни стратегии за дизайн на инженерните протеини, представляващи различни структурни модификации: 1. Сайт-специфична мутагенеза; 2. Конюгати антияло-лекарство; 3. PEG-илиране; 4. Гликозилиране; 5. Fc синтез; 6. Синтез на други протеини; 7. Липидиране; 8. Прикрепване на не-

PEG-полимери; 9. Свърх зареждане; 10. Изчислителен дизайн (7).

ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Анализ на съвременните дизайни на терапевтичните инженерни протеини от гледна точка на повишен афинитет, специфичност, стабилност, клетъчна пропускливост и фармакокинетика, както и намалени дози във връзка с възможна нежелана имуногенност.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Използвани са документални методи за анализ на публикувани научни данни от предклинични и клинични изпитвания на инженерни протеини за терапевтични цели и приложените стратегии за дизайн на протеиновата структура и архитектура.

РЕЗУЛТАТИ

Стратегиите за дизайн на протеини с цел терапевтично приложение могат да бъдат разделени на утвърдени (лекарствените продукти са одобрени за клинична употреба) и нови (лекарствените продукти са обект на предклинични и клинични изпитвания).

1. *Сайт-специфична мутагенеза*. Този подход се прилага за въвеждане на точкови мутации в аминокиселинната последователност и е широко използван метод за придаване на подобрени свойства на терапевтичните инженерни протеини (8). Класически пример за това е разработването на инсулинови аналози с различна фармакокинетика. Например заместването на аспаргин с глицин на аминокиселинна позиция 21 на α -веригата и добавянето на два аргинина към β -веригата на инсулин води до структурирането на *insulin glargine* - дългодействащ инсулинов аналог за времеви период от 24 ч (9).

Целевите мутации могат също да се използват за стабилността на протеина в разтвор, което води до по-малка склонност към нежелана протеинова агрегация. Една добре установена модификация включва заместване на свободни цистеини с други аминокиселини като серин, за да се предотврати образуването на ненативни дисулфидни връзки или окисление на цистеиновите остатъци, водещо до тиолови адукти или цистеинова киселина (10). Тази стратегия е използвана в различни, одобрени лекарствени терапии, базирани на инженерни протеини като *aldeslakin*, *interferon- β 1b*, *pegfilgrastim* и др.

Валидираните точкови мутации също често се използват за контролиране на поведението на IgG-базираните *Ab in vivo*. Например циркулационният полуживот може да бъде регулиран чрез въвеждане на замествания в Fc областта, които променят естеството на свързващите взаимодействия с неонаталния Fc рецептор (FcRn), присъстващ в ендозомите на различни видове клетки. Насърчаването на свързване в условията на ендозомално pH < 6,5 води до транспортиране на Ab към клетъчната повърхност, която експресира FcRn, вместо Ab да бъде препратено към лизозомата за разграждане. На клетъчната повърхност повишаването на pH води до загуба на афинитет на свързване и освобождаване на Ab в кръвообращението. Този механизъм, медиран от FcRn, играе ключова роля в регулирането на циркулационния полуживот на Ab. Чрез настройване на силата на свързване на Fc към FcRn циркулационният полуживот може да бъде удължен или съкратен (11). Fc домейни с аминокиселинни замествания M428L/N434S (вариант LS) и M252Y/S254T/T256E (YTE) представляват 2 общи примера за такива модификации (12).

LS вариантът например е използван в одобрената лекарствена терапия *ravulizumab* за увеличаване на циркулационния полуживот в сравнение с изходното анти тяло *eculizumab*.

Основно предизвикателство при въвеждането на специфични за мястото мутации е, че мутацията може да повлияе негативно на стабилността и функцията на протеина, което в много случаи трудно може да бъде предвидено предварително.

2. *Конюгати анти тяло-лекарство (ADC)*. Представяват нововъзникващ клас лекарствени продукти, които обикновено се използват за лечение на онкологични заболявания. ADC се състоят от Ab, конюгирано с цитотоксично лекарство чрез линкерен модул. ADC използват Ab като насочващ компонент за свързване със специфичен антиген, който се експресира на повърхността на туморните клетки, за да постигнат селективно клетъчно доставяне на мощни цитотоксични средства, които биха били твърде токсични за организма при самостоятелно приложение и конвенционална нецелева доставка. Този метод увеличава терапевтичната ефикасност и безопасност на терапиите, базирани на инженерни протеини (13). Одобрените към 2024 г. ADC терапии са представени на табл. 1.

Днес все още няколко приоритета на изследване остават отворени в областта на ADC. Конюгирането на лекарствени продукти с лизинови или цистеинови остатъци на Ab води до структури с различни

Табл. 1. Одобрени ADC терапии към 2024 г.

ADC терапия	Таргетен антиген	Линкер	Цитотоксичен продукт	Терапевтично показание
Gemtuzumab orogamicin	CD33	Киселинно лабилен хидразон	Calicheamicin	AML
Brentuximab vedotin	CD30	Ензим	Monomethyl auristatin E	HL, ALCL
Trastuzumab emtansine	HER2	Тиоетер	Maytansine derivative	HER2 ⁺ mBc
Inotuzumab ozogamicin	CD22	Киселинно лабилен хидразон	Calicheamicin	ALL
Polatuzumab vedotin	CD79b	Ензим	Monomethyl auristatin E	LBCL
Enfortumab vedotin	Nectin-4	Ензим	Monomethyl auristatin E	UC
Trastuzumab deruxtecan	HER2	Ензим	Exatecan derivate	GEAC
Sacituzumab govitecan	Trop-2	Киселинно лабилен хидразон	Active metabolit of irinotecan	TNBC
Loncastumab tesirine	CD19	Ензим	Pyrrolobenzodiazepine dimer	LBCL, HGBCL
Tisotumab vedotin	TF	Ензим	Monomethyl auristatin E	CC
Mirvetuximab soravtansine	FR α	Дисулфидна връзка	Maytansine derivative	EOC, FTC, PPC
Moxetumomab pasudotox	CD22	Ензим	Exotoxin A fragment	R/R HCL
Belantamab mafodotin	BCMA	Ензим	Maleimidocaproyl monomethyl auristan F	R/R MM

Използвани съкращения: AML – acute myeloid leukemia, ALCL – Anaplastic large-cell lymphoma, HL – Hodgkin lymphoma, mBc – metastatic breast cancer, ALL – acute lymphoblastic leukemia, UC – urothelial cancer, GEAC – gastroesophageal adenocarcinoma, TNBC – triple negative breast cancer, HGBCL – high grade B-cell lymphoma, LBCL – large B-cell lymphoma, CC – cervical cancer, PPC – primary peritoneal cancer, FTC – fallopian tube cancer, EOC – epithelial ovarian cancer, MM – multiple myeloma, HCL – hairy cell leukemia, R/R – relapsed or refractory

лекарствени натоварвания, което означава, че на пациентите се прилага смес от различни молекулярни конфигурации (14). Това е важно да се има предвид, защото всеки вариант има уникален профил на токсичност, склонност към агрегиране, фармакокинетика, целеви афинитет и ефикасност (15). Следователно изследването на стратегии за специфично място за конюгиране на Ab с цел постигане на равномерно натоварване с терапевтичен продукт остава активна област за научна работа.

3. *PEG-илиране*. Една от най-честите стратегии за удължаване на полуживота на терапевтичните инженерни протеини е прикрепването на полиетилен-гликолови вериги към повърхността (PEG-илиране). По този начин се увеличава общият хидродинамичен диаметър и се намалява скоростта на екскреция на лекарството от бъбреците. Освен това PEG-илирането може да подобри разтворимостта, да противодейства на протеолитичното разграждане и да предпази имуногенните епитопи от разпознаване от имунната система (7). Одобрените за клинична употреба PEG-протеинови терапии са представени в табл. 2.

Ранната работа в областта на PEG-илирането до голяма степен модифицира протеини по неспецифичен начин чрез конюгиране на аминокостатъци

на лизин и N-края на аминокиселинната верига (7). PEG молекулите, използвани в началото, са представлявали смес от вериги с различна дължина. Това е предизвикателство, защото полученият хетерогенен набор от продукти може да има значително различни терапевтични свойства. В този контекст по-късните усилия се фокусират върху идентифициране на специфично целево място за PEG-илиране на инженерните протеини. Например certolizumab pegol съдържа конструиран несдвоен цистеин за конюгиране с PEG (16).

Както другите модификации, така и PEG-илирането може да повлияе отрицателно върху протеиновата активност. Самият PEG може понякога е имуногенен, което е мотивирало изследователите да проучат възможностите за използване на не-PEG полимери като алтернатива. Съществуват също опасения за нежелано натрупване на PEG in vivo. За да се преодолее това предизвикателство, са направени опити за включване на биоразграждащи се елементи в PEG веригите (17).

4. *Fc синтез*. Представяват Fc слети протеини, при които Fc сегментът на Ab е слят с биологично активен пептид с цел постигане на атерапевтичен ефект. Обикновено Fc сливането се прави, за да се увеличи полуживотът на циркулацията чрез уве-

Табл. 2. Одобрени PEG-протеинови терапии към 2024 г.

PEG-протеинов лекарствен продукт	Инженерен протеин	Търговска марка	Терапевтично поведение
Pegunigalsidase-α	α-galactosidase	Elfabric	FD
Pegfilgrastim	G-CSF	Neulasta, Fylmetra, Stimufend, Nyvepria, Ziextenzo	FN
Eflapegrastim	Long-acting G-CSF	Rolvedon	FN
Lonapegsomatropin	Human growth hormone	Skytrofa	GHD
Ropeginterferon-α-2b	Interferon	Besremi	PV
Turoctocog-α	Factor VIII	Esperoct	HPA
Damoctocog-α pegol	Factor VIII	Jivi	HPA
Pegvaliase	Phenylalanine metabolizing enzyme	Palynziq	PKU
Elapegademase	Adenosine deaminase	Revcovi	ADA-SCID
Calaspargase pegol	L-asparaginase II	Asparlas	ALL
Glucopregulated coagulation factor IX	Factor IX	Rebinyon	HPB
Rurioctocog-α pegol	Factor VIII	Adynovate	HPA
Peginterferon-β-1a	Interferon	Plegridy	MS
Peginterferon-α-2b	Interferon	Sylatron	atML
Pegloticase	Porcin-like uricase	Krystexxa	t/r CG
Certolizumab pegol	mAb specific to TNF-α	Cimzia	CD, RA, PA, AS
Methoxy PEG-epoetin-β	Erythropoietin	Mircera	CKD
Pegvisomant	Growth hormone receptor antagonist	Somavert	AM
Peginterferon-α-2a	Interferon	Pegasys	CHC
Peginterferon-α-2b	Interferon	PegInterferon	CHC
Pegaspargase	Asparaginase	Oncaspar	ALL
Pegademase bovine	Adenosine deaminase	Adagen	ADA-SCID

Използвани съкращения: FD – Fabry disease, FN - Febrile neutropenia, GHD – growth hormone deficiency, PV – polycythemia vera, HPA – hemophilia A, PKU – phenylketonuria, ALL - acute lymphoblastic leukemia, HPB – hemophilia B, MS – multiple sclerosis, atML – adjuvant treatment of melanoma, CG - chronic gout, CD – Crohn’s disease, RA – rheumatoid arthritis, PA – psoriatic arthritis, AS – ankylosing spondylitis, CDK – chronic kidney disease, AM – acromegaly, CHC – chronic hepatitis C

личаване на хидродинамичния диаметър на слетия протеин, за да се забави бъбречната филтрация. Освен това Fc сегментът може също да помогне за стимулиране на ефекторния отговор, както и да оптимизира пространствената конфигурация чрез димеризация поради образуването на дисулфидна връзка между Fc групите, какъвто е примерът с etanercept. Тази димеризация води до пространствена структура, която има значително по-висок афинитет към TNF-α в сравнение със самия рецептор (18).

Fc синтезът предлага също предимството цялата протеинова структура да бъде генетично кодирана с помощта на технологиите на генното инженерство. Това е в контраст с PEG-илирането, където PEG е химически конюгиран след протеиновата експресия.

Fc-протеиновите терапии, разбира се, имат и своите недостатъци. Включването на Fc компонент може да предизвика ефекторен отговор (ADCC, ADCP) дори в стимулации, когато това не е желателно. Освен това Fc компонентът може да бъде предразположен към разграждане от протеази in vivo (19).

Одобрените за клинична употреба Fc-протеинови терапии са представени на табл. 3.

5. *Конюгиране с други протеини.* Обща стратегия за увеличаване на полуживота на инженерните протеини е конюгирането им с други протеини, които имат дълго време на циркулация, като човешки серумен албумин (HAS), който е с полуживот от 19 дни (20). Конюгацията с HAS увеличава размера на структурата, намалявайки скоростта на бъбречна филтрация, и защитава терапевтичния инженерен

Табл. 3. Одобрени Fc-протеинови терапии към 2024 г.

Fc-протеинова терапия	Инженерен протеин	Търговска марка	Терапевтично поведение
Etanercept	TNF inhibitor	Enbrel	RA, JIA, PA, PP, AS
Alefacept	CD4+/CF8+ inhibitor	Amevive	PP
Abatacept	IgG1/CTLA-4	Orencia	RA, JIA, PA
Rilonacept	IL-1 inhibitor	Arcalyst	MWs, RP
Romiplostim	Thrombopoietin	Nplate	CITP
Belatacept	IgG1/CTL-4	Nulojix	PEGT
Aflibercept	VEGF inhibitor	Eylea	ARMD
Ziv-aflibercept	VEGF/P1GF inhibitor	Zaltrap	mCRC
Conbercept	VEGF inhibitor	Lumitin	ARMD
Efmoroctocog-α	RFVIII Fc	Elocta	HPA
Eftrenonacog-α	RFIX Fc	Alprolix	HPB
Dulaglutide	GLP-1 agonist	Trulicity	T2D
Asfotase-α	ALP	Strengiq	HPP
Luspatercept	ActRIIb/IgG1	Reblozyl	BT, MDS

Използвани съкращения: TNF – tumor necrosis factor, RA - rheumatoid arthritis, JIA – juvenile idiopathic arthritis, PA – psoriatic arthritis, PP - plaque psoriasis, AS – ankylosing spondylitis, MWs – muckle wells syndrome, RP – recurrent pericarditis, CITP – chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, PEGT – provide extended graft and transplant, ARMD – age related macular degeneration, mCRC – metastatic colorectal cancer, HPA – hemophilia A, HPB – hemophilia B, HPP – hypophosphatasia, ALP – alkaline phosphatase, T2D – type 2 diabetes, BT – beta thalassemia, MDS – myelodysplastic syndrome

протеин от потенциално разграждане от протеази *in vivo*. Освен това HAS сливането осигурява значително подобрене във фармакокинетичния профил на лекарствения продукт. Забележителен пример за клиничен успех е albutrepenonacog-α, показан за лечение на хемофилия В. Конюгирането на протеини може също да бъде използвано за създаването на инженерни биспецифични агенти. Подходящ пример е лекарственият продукт blinatumomab, който се състои от два различни едноверижни променливи фрагмента (scFv) на Ab, свързани заедно чрез пептидна част. Единият scFv фрагмент разпознава CD3, експресиран върху Т-клетки, докато другият scFv разпознава CD19 върху злокачествени В-клетки. По този начин едновременно свързване към двата целеви антигена насочва активираните имунни клетки към туморните клетки, след което Т-клетките - чрез секретиране на различни ензими, лизират туморните клетки (21).

Общо предизвикателство пред лекарствените продукти, базирани на инженерни конюгирани протеини, е, че терапевтичният протеин може да загуби активност, ако мястото на свързване е блокирано в процеса на конюгиране.

6. Гликозилирани инженерни протеини. Гликозилирането е посттранслационна модификация, медирана от вътреклетъчен ензимен механизъм, при който олигозахаридните групи са ковалентно конюгирани към протеиновата структура най-често при

аспарагинови или серин/треонинови остатъци (22). Гликозилирането на инженерните протеини повлиява положително имуногенността, стабилността, активността и фармакокинетиката. В резултат на това гликоинженерството е добре проучена стратегия за подобряване на терапевтичните свойства на протеините.

Една от стратегиите на гликоинженерството включва промяна или добавяне на сайтове за гликозилиране. Подходящ пример е аналогът на erythropoietin - darbepoetin-α, конструиран с две допълнителни места на N-свързано гликозилиране (23). Тази модификация подобрява полуживота на лекарствения продукт повече от три пъти поради увеличаване размера на протеина и съответно - добавяне на бъбречната филтрация.

Друга стратегия на гликоинженерството на Ab е съзряването на структури с подобрени свойства. Например клетки гостоприемници от яйчник от китайски хамстер (CHO) могат да бъдат програмирани да експресират Ab, които нямат фукозни захарни групи. Този процес се нарича афукозилиране. Когато се приложи във Fc областта на Ab, афукозилирането може да увеличи свързването към FcγRIIIa рецепторите. Това подобрява набирането и активирането на имунни ефекторни клетки, което води до повишена ADCC или ADCP ефективност спрямо туморни клетки. Подходящ пример за клинично приложение на афукозилиран инженерен протеин е

mogamulizumab, показан за лечение на рецидивираща или рефрактерна фунгоидна микоза или синдром на Sezary (23).

Въпреки че е мощен подход, остават предизвикателствата пред модифицирането на протеини чрез гликоинженерството, вкл. предвиждането как гликозилирането ще се отрази на протеиновите свойства и загубата на активност.

7. *Липидирани инженерни протеини.* Конюгирането на липидни групи с протеини е използвано за подобряване на терапевтичните ефекти при няколко, одобрени за клинична употреба, инженерни протеинови терапии (табл. 4).

Липидирането насърчава образуването на ди-хексамери при инжектиране, което забавя абсорбцията и също така увеличава свързването на албумин, увеличаващо полуживота на инженерните протеини. Много подходящ пример за удължаване на полуживота е представен от insulin icodec, липидиран инсулинов аналог, изследван в клинични изпитвания, който изисква прилагане еднократно седмично (25). Друга полза от липидирането е способността му да насърчава вътреклетъчното доставяне на протеини, което потенциално може да позволи насочване на молекули в интрацелуларна среда.

8. *Изчислителен дизайн.* Функцията на един ин-

Табл. 4. Одобрени липидирани протеинови терапии към 2024 г.

Липидирана протеинова терапия	Инженерен протеин	Търговска марка	Терапевтично поведение
Insulin detemir	Insulin analog	Levemir	T1D, T2D
Insulin degludec	Insulin analog	Tresiba	T1D, T2D
Daptomycin	Lipopeptide antibiotic	Cubicin	Gram-positive infections
Polymixin B	Lipopeptide antibiotic	Poly-Rx	Gram-positive infections
Tesamorelin	GHRH	Egrifta SV	HALD
Liraglutide	GLP-1ra	Victoza, Saxenda	T2D, obesity
Semaglutide	GLP-1ra	Ozempic, Rybelsus	T2D, obesity
Somapacitan	hGH-1ra analog	Sogroya	GHD
Tirzepatide	GLP-1ra/GIRP	Mounjaro, Zepbound	T2D, obesity
Mufamurtide	MDP	Meract	OS
Insulin degludec/liraglutide	Insulin analog/GLP-1ra	Xultophy	T2D

Използвани съкращения: T2D – type 2 diabetes, T1D – type 1 diabetes, GHRH – growth hormone-releasing hormone, HALD – HIV-associated lipodystrophy, GLP-1ra – glucagon-like peptide-1 receptor agonists, GHD – growth hormone deficiency, GIRP – gastric inhibitory polypeptide receptor, OS – osteosarcoma, MDP – muramyl dipeptide

Липидирането често се извършва за подобряване на фармакокинетиката поради способността на липидите да се свързват с HSA, като по този начин се подобряват структурните характеристики на инженерните протеини. Липидирането е алтернатива на директното протеиново сливане. Потенциално предимство, предлагано от тази стратегия, е, че взаимодействието между липидите и HSA е обратимо и терапевтичният протеинов компонент на структурата може да предизвика своя ефект, след като вече не е химично и стерично свързан с партньорския конюгиран протеин. В определени ситуации присъствието на липидната група може също да насърчи обратимо образуване на мултимер при подкожно инжектиране, което води до удължено освобождаване в организма (24).

женерен протеин може да бъде оптимизирана чрез изчислителен дизайн. Тази стратегия се базира на хипотезата на Anfinsen, че протеините се нагъват в своята конформация с минимален разход на енергия (26). Следователно ефектът от различни аминокиселинни последователности върху пространствената структура може да бъде систематично изследван с помощта на специализиран софтуер и свързан с протеиновата функция.

Изчислителният дизайн може да се използва за оптимизиране на различни химични, физични и фармакологични свойства на терапевтичните инженерни протеини (27). Това включва подобряване на стабилността, афинитета на свързване, ефекторната ефективност на Ab и имуногенността.

В резултат на тези предимства de novo протеиновият дизайн се очертава като особено привлека-

телен подход за проектиране на терапевтични инженерни протеини. Това позволява относително бързо софтуерно проектиране, като се използват фундаменталните принципи на протеиновата биофизика.

Докато по-голямата част от протеиновото инженерство се фокусира върху подобряване на функциите на съществуващи протеини, често използвайки целеви мутации, дизайнът на протеини *de novo* се фокусира върху аминокиселинни последователности, които не се срещат в природата. Усилията в тази научна област водят до откриването на мощни имитатори на цитокини (IL-2, IL-15), агонисти на PD-1 и инхибитори на SARS-CoV-2. Забележителен пример е NL-201, имитатор на IL-2 и пръв в света инженерен протеин, проектиран *de novo*, който демонстрира големи надежди като имунотерапия при онкологични заболявания. Природният IL-2 има ограничено клинично приложение поради своята токсичност, която произтича от свързването към α -веригата на IL-2 рецептора. Обратно, NL-201 се свързва изключително с β - и γ -веригата на IL-2 рецептора, което индуцира пролиферацията на антитуморни ефекторни Т-клетки, като същевременно избягва токсичността (28).

9. Свърхзаредени протеини. Това е нова стратегия за протеинов дизайн, базирана на идеята за протеинови структури, които съдържат повече от един нетен заряд за всеки килодалтон тегло (29).

Тези силно заредени протеини могат или да бъдат конструирани, или да бъдат открити в природата и предлагат уникални свойства. Свърхзаредените протеини показват силна устойчивост на агрегация, произтичаща от термичен или химичен стрес. Това означава, че при разгъване поради напрежение свърхзаредените протеинови варианти могат да се преконфигурират и да проявят значителна активност дори в случаите, когато нативният протеин не може. Освен това положително свърхзаредените протеини могат да проникнат в клетките в големи количества чрез свързване с протеоглигани на клетъчната повърхност, което ги прави много полезни като партньори за синтез, за да доставят други протеини вътреклетъчно (30).

10. Конюгиране на не-PEG полимери. Това е друга, нова стратегия за дизайн на терапевтични протеини, която е активна област на изследване. DNA е обещаваща опция в това отношение, при която функционалното ковалентно свързване на протеини с DNA води до структури, наречени „протеинови сферични нуклеинови киселини“ (ProSNA), притежаващи няколко полезни свойства: 1. DNA об-

вивката придава повишена устойчивост на протеази и разтворимост; 2. ProSNA демонстрира повишено време за циркулация и разпределение извън черния дроб; 3. Многократно увеличено клетъчно усвояване на ProSNA в сравнение с немодифицираните протеини (31).

Няколко експериментални опита са използвали ProSNA, вкл. за доставяне на високоактивни протеини и за интрацелуларно откриване на туморни биомаркери (32).

11. Други партньори за синтез. Използването на полипептидни вериги като конюгиращи партньори на терапевтични протеини също е активна област на изследване. Подходящ пример е пептид, наречен XTEN, който се използва за конюгиране с терапевтични протеини с цел увеличаване на времето за циркулация и за понижаване на имуногенността. Efanesoctocog- α е първата лекарствена терапия на базата на протеини, използвайки технологията XTEN, която получава одобрение от FDA през 2023 г. за лечение на пациенти с хемофилия А.

Съществуват и други примери за стратегии, вдъхновени от конюгирането на полипептид, вкл. използването на супер хидрофилни цвителионни пептиди за подобряване на времето за циркулация и стабилността (33).

12. Неестествени аминокиселини (UAA). Включването на UAA в протеинови структури е особено интересна област на научни изследвания, тъй като те могат да бъдат поставени на специфично място и техните биортогонални функционални групи могат да бъдат използвани за химично конюгиране. Например наскоро е разработена стратегия, наречена „реактивна терапия с активирана близост“ (PERx) за генериране на ковалентни протеинови лекарствени терапии (34). Изследователите включват биореактивната аминокиселина флуорофосфат-L-тирозин в PD-1, която може да се прикрепя ковалентно към проксимален хистидин върху PD-L1 само при взаимодействие PD-1/PD-L1. Получената по този начин протеинова структура показва драматично увеличение на активността спрямо див тип PD-1 (35).

ОБСЪЖДАНЕ

Клиничното приложение на терапии, базирани на инженерни протеини, вече направи революция в медицината и все повече нараства по обхват и значение. Всяка одобрена протеинова терапия има набор от желани свойства като конформационна и колоид-

дна стабилност, достатъчно време за циркулация, висока ефективност и липса на токсичност.

Стратегиите за протеинов дизайн, които подобряват тези характеристики, са важни за научната област и катализират нейния напредък.

Предвижда се продължаване на използването на установените протеинови модификации като PEG, ADC и протеиновите конюгати. Очаква се също устойчив растеж на новите стратегии за дизайн на протеини, които подобряват определени свойства, без да оказват отрицателно въздействие върху други. В този контекст бъдещият прогрес в изчислителните софтуерни възможности, които позволяват *de novo* терапевтичен протеинов дизайн, ще бъде инструмент за създаване на протеинови структури, проявяващи желани свойства във всички аспекти.

Като се има предвид, че много стратегии за модификация водят до хетерогенни продукти, бъдещите изследвания на специфичните места за конюгиране остават много решаващи. Тези усилия са особено важни, тъй като всеки хетерогенен краен продукт в сложна смес може да се различава по своите фармакологични свойства, включително ефикасност и безопасност.

Интрацелуларните терапевтични цели също се очаква да бъдат област на засилен научен интерес в бъдеще. Това предполага задълбочаване на фокуса върху стратегии, които да облекчат доставянето на протеини в клетките, като свръхзареждане или модифициране на повърхността с DNA. След навлизането в клетката, следващото предизвикателство ще бъде постигането на специфичност на ниво клетъчен органел, за да се реализира терапевтичното действие.

Бъдещото развитие на инженерни протеинови структури, които могат да достигнат до трудни за насочване места в организма като мозъка, също ще отключи нови възможности в тази област.

Взети заедно, тези постижения и перспективи ще модулират устойчивата еволюция на инженерните протеинови терапии в ролята им на основни инструменти в съвременната медицина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лекарствените терапии, базирани на инженерни протеини, въвеждат нови парадигми в лечението на болестите в края на XX и началото на XXI в. Днес инженерните протеини са в класацията на най-продаваните лекарствени продукти в световен мащаб.

Напредъкът в рационалния протеинов дизайн включва утвърдени стратегии (сайт-специфична мутагенеза, конюгати антитяло-лекарство, пегили-

ране, Fc слети протеини, конюгиране с други протеини, гликозилиране, липидиране) и нови стратегии (изчистен дизайн, свръхзаредени протеини, конюгиране на полимери, различни от полиетилен гликол, неестествени аминокиселини). Взети заедно, тези стратегии за протеинов дизайн ще модулират устойчивата еволюция на инженерните протеинови терапии в ролята им на основни инструменти в съвременната медицина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(1):21-39. doi: 10.1038/nrd2399.
2. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):298-306. doi: 10.1038/nrd1695.
3. Hoyt E, Cal P, Bruno L et al. Contemporary approaches to site-selective protein modification. *Nat Rev Chem.* 2019;3:147-171. doi: 10.17863/CAM.36322
4. Radeva-Ilieva M. A review of cancer immunotherapy: immune checkpoint inhibitors. *Annual for Hospital Pharmacy.* 2023;9(1):36-43. doi: 10.14748/ahp.v9i1.9187;
5. Tsenov S, Radeva-Ilieva M, Grigorov E. Present and future of targeted therapies in oncology. *Bulgarian Journal of Public Health.* 2023;15(3):5-15. doi: 10.5281/zenodo.10157603
6. Kontos S, Hubbell JA. Drug development: longer-lived proteins. *Chem Soc Rev.* 2012;7;41(7):2686-95. doi: 10.1039/c2cs15289d. Epub 2012 Feb 6.
7. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(3):214-21. doi: 10.1038/nrd1033.
8. Marshall Sh, Lazar G, Chirino A, Desjarlais J. Rational design and engineering of therapeutic proteins. *Drug Discov Today.* 2003;1;8(5):212-21. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02610-2.
9. Varendijk AJ, Janssen JA. Insulin and its analogues and their affinities for the IGF1 receptor. *Endocrine-related cancer.* 2012;19:F63-75. doi: 10.1530/ERC-12-0026
10. Xia X, Longo LM, Blaber M. Mutation choice to eliminate buried free cysteines in protein therapeutics. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):566-76. doi: 10.1002/jps.24188.
11. Saunders KO. Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life. *Front Immunol.* 2019;10:1296. doi: 10.3389/fimmu.2019.01296.
12. Loo YM, McTamney, Arends R et al. The SARS-CoV-2 monoclonal antibody combination, AZD7442, is protective in non-human primates and has an extended half-life in humans. *Sci Transl Med.* 2022;25:eabl8124. doi: 10.1126/scitranslmed.abl8124
13. Chari RV, Miller ML, Widdison WC. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(15):3796-827. doi: 10.1002/anie.201307628.
14. Guo J, Kumar S, Chipley M et al. Characterization and Higher-Order Structure Assessment of an Interchain

- Cysteine-Based ADC: Impact of Drug Loading and Distribution on the Mechanism of Aggregation. *Bioconjug Chem.* 2016;27(3):604-15. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00603
15. Axup J, Bajjuri K, Ritland M et al. Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(40):16101-6. doi: 10.1073/pnas.1211023109.
 16. Park A, Honey DM, Hou L et al. Carbohydrate-mediated polyethylene glycol conjugation of TSH improves its pharmacological properties. *Endocrinology.* 2013;154(3):1373-83. doi: 10.1210/en.2012-2010.
 17. Lundberg P, Lee BF, Van den Berg SA et al. Poly((ethylene oxide)-co-(methylene ethylene oxide)): A hydrolytically-degradable poly(ethylene oxide) platform. *ACS Macro Lett.* 2012;1(11):1240-1243. doi: 10.1021/mz300477t
 18. Mohler KM, Torrance DS, Smith CA et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol.* 1993;151(3):1548-61. PMID: 8393046
 19. Shiga Y, Murata D, Sugimoto A et al. Hinge-Deficient IgG1 Fc Fusion: Application to Human Lactoferrin. *Mol Pharm.* 2017;14(9):3025-3035. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00221
 20. Liu Z, Chen X. Simple bioconjugate chemistry serves great clinical advances: albumin as a versatile platform for diagnosis and precision therapy. *Chem Soc Rev.* 2016;45(5):1432-56. doi: 10.1039/c5cs00158g
 21. Einsele H, Borghaei H, Orlowski R et al. The BiTE (bispecific T-cell engager) platform: Development and future potential of a targeted immuno-oncology therapy across tumor types. *Cancer.* 2020;126(14):3192-3201. doi: 10.1002/cncr.32909
 22. Ballew N, Gerngross T. Production of therapeutic proteins in fungal hosts. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4(5):623-6. doi: 10.1517/14712598.4.5.623
 23. Dammen-Brower K, Epler P, Zhu S et al. Strategies for Glycoengineering Therapeutic Proteins. *Front Chem.* 2022;13:10:863118. doi: 10.3389/fchem.2022.863118.
 24. Menacho-Melgar R, Decker JS, Hennigan JN, Lynch MD. A review of lipidation in the development of advanced protein and peptide therapeutics. *J Control Release.* 2019;295:1-12. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.12.032
 25. Venanzi M, Savioli M, Cimino R et al. A spectroscopic and molecular dynamics study on the aggregation process of a long-acting lipidated therapeutic peptide: the case of semaglutide. *Soft Matter.* 2020;16(44):10122-10131. doi: 10.1039/d0sm01011a
 26. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 1973;20;181(4096):223-30. doi: 10.1126/science.181.4096.223
 27. Vivona S, Gardy JL, Ramachandran S. Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. *Trends Biotechnol.* 2008;26(4):190-200. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.12.006
 28. Silva D-A, Yu S, Ulge U et al. De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. *Nature.* 2019;565(7738):186-191. doi: 10.1038/s41586-018-0830-7
 29. Ma C, Malessa A, Boersma A et al. Supercharged Proteins and Polypeptides. *Adv Mater.* 2020;32:e1905309. doi: 10.1002/adma.201905309
 30. Cronican J, Beier K, Davis T et al. A Class of Human Proteins that Deliver Functional Proteins into Mammalian Cells In Vitro and In Vivo. *Chem Biol.* 2011;18:833-838. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.07.003
 31. Brodin J, Sprangers H, McMillan JR, Mirkin CA. DNA-Mediated Cellular Delivery of Functional Enzymes. *J Am Chem Soc.* 2015 Dec 2;137(47):14838-41. doi: 10.1021/jacs.5b09711
 32. Samanta D, Ebrahimi S, Kusmierz C et al. Protein Spherical Nucleic Acids for Live-Cell Chemical Analysis. *J Am Chem Soc.* 2020;142(31):13350-13355. doi: 10.1021/jacs.0c06866
 33. McMullen P, Fang L, Qiao Q et al. Impacts of a Zwitterionic Peptide on its Fusion Protein. *Bioconjug Chem.* 2022;17;33(8):1485-1493. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.2c00176
 34. Wals K, Ovaa H, Klauser P et al. Unnatural amino acid incorporation in E. coli: current and future applications in the design of therapeutic proteins. *Front Chem.* 2014;2:15. doi: 10.3389/fchem.2014.00015.
 35. Li Q, Chen Q, Klauser PC et al. Developing Covalent Protein Drugs via Proximity-Enabled Reactive Therapeutics. *Cell.* 2020;182(1):85-97.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.028.

**Адрес за кореспонденция:**

Тони Веков
МБАЛ „Сърце и мозък“
ул. „Пиер Кюри“ 2
Плевен, 5804
e-mail: t.vekov.mu.pleven@abv.bg

ORCID: 0000-0001-5033-009X