

## Таргетная радионуклидная детекция злокачественных опухолей с использованием аффибоди

О. Д. Брагина<sup>1,2</sup>, А. А. Несынов<sup>1\*</sup>, Е. Ю. Ситникова<sup>3</sup>, С. В. Паталяк<sup>1,3</sup>, С. М. Деев<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, 634009 Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, 634050 Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, 634050 Россия

<sup>4</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение науки Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

\*E-mail: nesynov.alex@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2025

Принята к печати 06.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27677

**РЕФЕРАТ** В представленном обзоре рассмотрены возможности использования молекул аффибоди в различных областях биотехнологии и клинической медицины. Показана высокая аффинность и специфичность молекул аффибоди к выбранным молекулярным мишениям, а также возможность визуализации различных злокачественных опухолей *in vivo*. Большее внимание уделено доклиническим и клиническим исследованиям коньюгатов аффибоди с различными радиоизотопами для проведения таргетной радионуклидной визуализации опухолей, что представляет особую актуальность в рамках проблем, возникающих на этапах диагностики и лечения данной категории пациентов. В клинических испытаниях показана хорошая переносимость радиофармацевтических препаратов и эффективность их использования для оценки распространенности опухолевого процесса и определения статуса HER2/ней у больных раком молочной железы, что обуславливает перспективность проведения дальнейших исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** злокачественные образования, терапия, таргетная радионуклидная диагностика, альтернативные каркасные белки, аффибоди.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЗНО – злокачественное новообразование; ИГХ – иммуногистохимия; РФП – радиофармпрепарат; АКБ – альтернативные каркасные белки; РФЛП – радиофармацевтический лекарственный препарат; ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; ФДГ – фтордезоксиглюкоза; FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*.

### ВВЕДЕНИЕ

По данным IARC (International Agency For Research On Cancer) ежегодно в мире регистрируется около 20 млн новых случаев онкологических заболеваний, при этом показатели смертности на 2022 год составили 9.7 млн. Отмечается тенденция к ежегодному приросту данных показателей. Так, согласно демографическим прогнозам, количество новых случаев злокачественных новообразований (ЗНО) достигнет 35 млн к 2050 году [1].

В Российской Федерации по данным на 2023 год зарегистрировано 674 тыс. случаев ЗНО, при этом прирост по сравнению с 2022 годом составил 8% [2]. Учитывая высокую распространенность и социально-экономическую значимость онкологических заболеваний, актуальными остаются разработка более прицельных методов диагностики ЗНО, новых лекарственных препаратов и способов преодоления резистентности к противоопухолевой терапии [3–5].

В настоящее время основной частью диагностического поиска в онкологической практике является получение опухолевого материала с последующей гистологической верификацией. Этот этап во многом определяет дальнейшую лечебную тактику, прогноз и необходимость применения дополнительных, в том числе молекулярно-генетических, исследований [6]. Опухолевый материал может быть получен путем core-биопсии, а также эксцизионной биопсии, включающей полное извлечение опухоли во время диагностического хирургического вмешательства [7, 8]. Используемые методики во всех случаях являются инвазивными и травматичными, а в некоторых случаях требуют восстановления и реабилитации пациентов, что сопровождается дополнительными финансовыми затратами. Так, проведение торакоскопических и лапароскопических манипуляций требует госпитализации больных, выполнение анестезиологического пособия, а также не исключает невозможность выполнения процедуры ввиду анатомического расположения опухоли, наличия множественных диссеминированных метастатических очагов и отказа пациента от выполнения манипуляции [9, 10]. Нерешенной остается проблема необходимости иммуногистохимического исследования дополнительных опухолевых структур (метастазов в регионарные лимфатические узлы и отдаленные органы и ткани), что обусловлено возможностью различий их рецепторного статуса по сравнению с первичной опухолью (межопухолевой гетерогенностью) и отсутствием возможности выполнения в рутинной практике врача-онколога [11, 12].

Кроме того, существует ряд проблем, связанных с гистологическим и иммуногистохимическим (ИГХ) исследованиями опухолевой ткани, обусловленными сложностями оценки происхождения опухолевых клеток в случае низкодифференцированных и апластических образований [13] и субъективностью оценки изучаемых параметров [14]. По данным статистики, процент расхождений между заключениями патоморфологов может составлять до ~30%, что обусловлено сложностями дифференциальной диагностики, человеческим фактором, а также возможностью использования дополнительных методов окрашивания [15, 16].

Несовершенство стандартных лучевых и морфологических методов, необходимость выполнения инвазивных манипуляций, высокие экономические затраты, а также возможные трудности в интерпретации и воспроизведимости результатов диктуют необходимость разработки и внедрения дополнительных диагностических процедур, способствующих расширению диагностических и терапевтических опций у больных злокачественными

образованиями, что будет способствовать увеличению продолжительности жизни и ее качества. В этой связи разработка новых подходов, основанных на применении малых молекул, в частности, имеющих антителоподобные функции и тропных опухолевым антигенам, представляется крайне актуальным.

### ТЕРАНОСТИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ

С развитием фундаментальной онкологии важным стало определение молекулярно-генетических параметров опухоли, что позволяет выявлять новые точки приложения лекарственной терапии, вплотную подводя к концепции персонифицированной медицины, то есть к назначению лечения, основанного на биологических особенностях опухоли каждого конкретного пациента с достижением максимальной эффективности [17]. Активно развивающимся направлением персонализированной медицины является тераностика, сочетающая диагностический этап, включающий определение различных молекулярных мишеней в опухолевой клетке и показания к терапии, с последующим прицельным терапевтическим воздействием на выявленные ранее у пациента маркеры опухолевого роста. Широкое использование тераностического подхода позволит достичь увеличения частоты ответа на проводимую терапию, снизить риск развития нежелательных явлений, улучшить общую и безрецидивную выживаемость, качество жизни пациентов, снизить экономическую нагрузку на здравоохранение [18].

Термин «тераностика» был впервые применен генеральным директором компании PharmaNetics Джоном Фанкхаузером в 1998 году для описания бизнес-модели собственной компании, заключавшейся в разработке диагностических панелей, предназначенных для последующего назначения специализированного лекарственного лечения [19]. Однако принцип использования одной и той же молекулы для диагностики и лечения онкологических заболеваний появился несколькими десятилетиями ранее. Важной вехой в формировании тераностического подхода стало открытие и широкое распространение радиоактивного йода, применяемого в терапии рака щитовидной железы [20]. Было показано, что визуализация опухоли с помощью изотопа йода-123 перед началом проведения радиоийодтерапии способствовала лучшему планированию тактики лечения. В результате сочетание йода-123 и йода-131 стало первой парой радиоизотопов, используемых в тераностике. Развитие радиохимии и совершенствование инструментальных методов исследования привело к значительному прогрессу в этом направлении [21]. Необходимо отметить, что уже более

10 лет существует журнал *Theranostics*, обобщающий многие современные данные в этом направлении ([www.thno.org](http://www.thno.org)). В последнее время это направление получило существенный импульс развития в связи с применением радионуклидов.

В зависимости от методов диагностики и терапевтического агента выделяют фото-, соно-, химио-, нано- и радиотераностику [22]. В рамках тераностического подхода большим потенциалом обладает *таргетная радионуклидная диагностика*, являющаяся единственным направлением тераностики, интегрированным в клиническую практику. Суть метода заключается в использовании меченых радиоизотопами «нацеливающих» молекул, прицельно связывающихся с рецепторами на поверхности опухолевых клеток. Излучение изотопов при этом фиксируется специализированной аппаратурой и обеспечивает не только анатомическую оценку распространенности опухолевого процесса у больных злокачественными образованиями, но и молекулярную оценку выявленных очагов без использования дополнительных инвазивных процедур с возможностью выполнения повторных исследований на этапах первичной диагностики и на этапах лечения [23–25].

В качестве «нацеливающего» модуля в составе радиофармпрепараторов (РФП) применяются различные молекулярные структуры, к которым относят полноразмерные моноклональные антитела, фрагменты антител, а также синтетические каркасные молекулы или альтернативные каркасные белки (АКБ), являющиеся наиболее перспективными для использования в таргетной радионуклидной диагностике [26–29].

### Альтернативные каркасные белки

Стремительное развитие технологий для осуществления клонального отбора полипептидов путем их связывания из обширных библиотек способствовало разработке нового класса связывающих белков с помощью методов белковой инженерии. Для снижения иммуногенности эти структуры были созданы на основе разнообразного набора каркасов, отличающихся по размеру и структурной организации от прототипа иммуноглобулина. На сегодняшний день описано множество различных классов неиммуноглобулиновых аффинных белков, основанных на разнообразии поверхностно расположенных аминокислотных остатков, локализованных либо в элементах вторичной структуры, либо в неструктурированных петлях, с последующей селекцией с использованием различных платформ отображения [30].

Структура данных соединений, как правило, состоит из постоянной каркасной части (постоян-

ная область) и вариабельной области (переменная область). При этом первый компонент содержит в своем составе пару  $\alpha$ -спиралей или  $\beta$ -слоев, образующих жесткую третичную структуру, и поддерживает конформационную стабильность, присущую белковым каркасам; второй же компонент представлен несколькими открытыми петлями или несколькими остатками в жестких вторичных структурах, обеспечивающих специфическую способность связываться с различными молекулами-мишениями посредством структурного спаривания лиганд–рецептор или химических взаимодействий [31].

Малый размер АКБ (4–15 кДа) играет важную роль в биораспределении и способности молекул проникать в ткань опухоли, что проявляется в существенном сокращении временного интервала от введения радиофармацевтического лекарственного препарата до начала исследования, степени накопления препарата в опухоли, а также определяет выбор подходящего под конкретные цели и время исследования радиоизотопа. Еще одной общей характеристикой АКБ является хорошая устойчивость к факторам внешней среды. Отсутствие в структуре АКБ дисульфидных мостиков, характерных для антител, а также достаточно плотная структура обуславливают высокую термоустойчивость, стабильность в кислых и щелочных условиях, устойчивость к протеолизу. Кроме того, для конъюгации с лекарственными препаратами или диагностическими реагентами в белковые каркасы с помощью химического синтеза могут быть введены дополнительные структуры. Небольшие белковые каркасы обычно растворимы и обладают хорошей физико-химической стабильностью, что благоприятствует их применению *in vivo*. Все перечисленные характеристики делают каркасные белки соединениями, универсальными для модификации и производства [32].

На текущий момент представителями класса альтернативных каркасных белков являются молекулы аффибоди, аффилины, антикалины, атрамеры, дарпины, домены типа ингибитора Кунитца, альбуминсвязывающие домены, имеющие сродство к белку (АДАПТы) и др. Каждый из них находится на различных этапах изучения с обязательным поиском точек последующего клинического применения.

### АФФИБОДИ В БИОТЕХНОЛОГИИ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Синтетическая молекула аффибоди является представителем класса альтернативных каркасных белков, имеющих доменное строение. Молекула аффибоди в своей основе имеет Z-домен – пептидный домен белка А золотистого стафилокок-

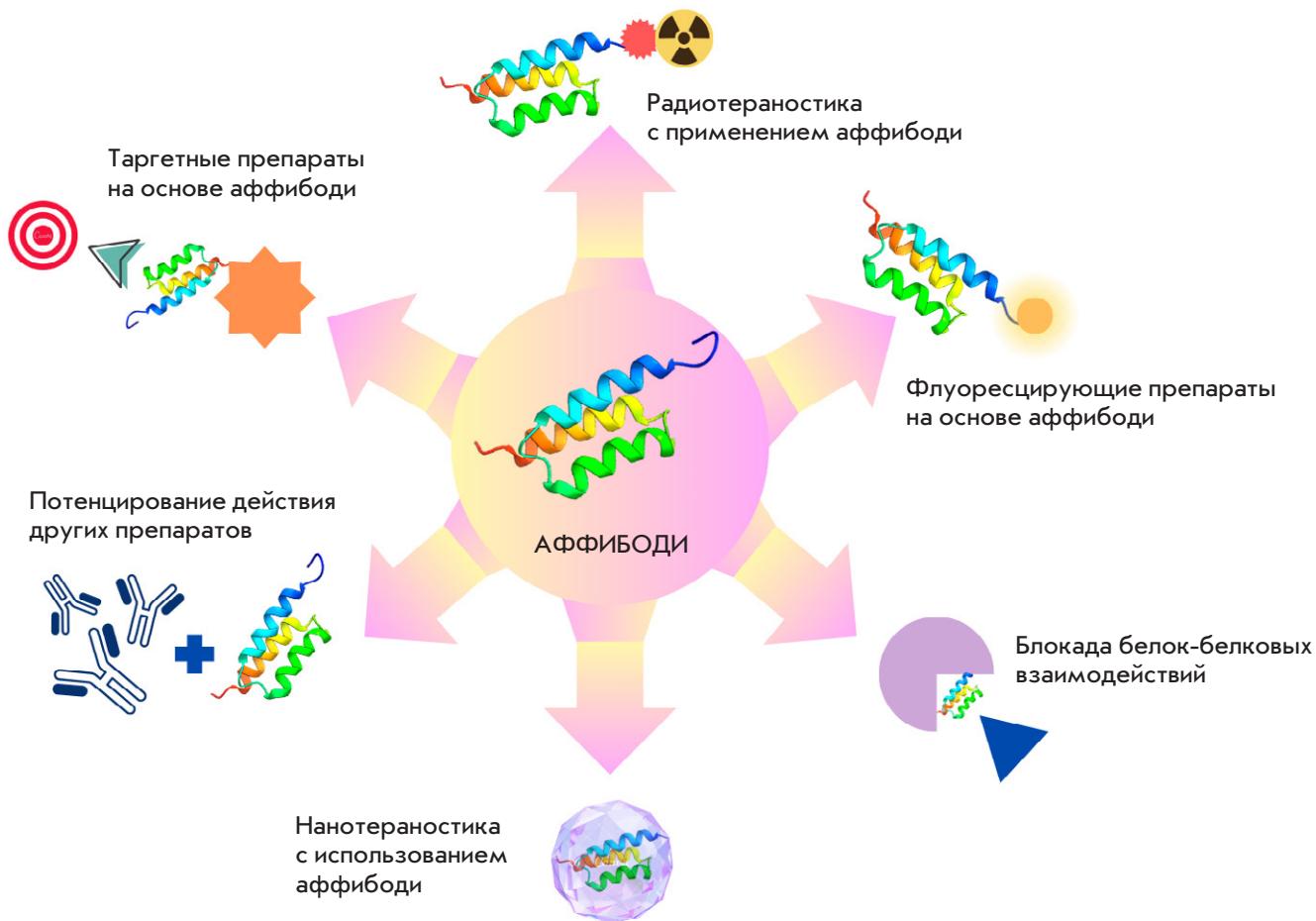


Рис. 1. Области применения молекул аффибоди в биотехнологии и клинической медицине

ка (*Staphylococcus aureus*) [33]. Пространственная структура Z-домена, состоящего из 58 аминокислотных остатков (а.о.) и имеющего достаточно низкую молекулярную массу (~6.5 кДа), образована тремя альфа-спиральами, формирующими бочонок. Молекулы аффибоди обладают хорошей структурной стабильностью, устойчивы к протеолизу, действию высоких температур (около 90°C), кислым и щелочным условиям (рН от 2.5 до 11) [34]. Комбинаторные библиотеки аффибоди могут быть получены путем рандомизации генов, кодирующих 13 а.о. в первой и второй спиральах Z-домена. Для этого используются фаговый, клеточный, рибосомный и мРНК-дисплеи. Для отбора молекул библиотеки смешивают с целевым антигеном, а затем подвергают вымыванию, в результате чего остаются только связавшиеся с лигандом пептиды. Полученные таким образом первичные нацеливающие молекулы в дальнейшем могут быть перандомизированы с целью повышения сродства к конкретной выбранной мишени [35]. Варианты, представляющие интерес, могут быть экспрессиро-

ваны в бактериальных, дрожжевых, клеточных системах или, ввиду небольшого размера, аффибоди могут быть получены также методами пептидного синтеза [36]. Включение функционализирующей группы в N- или C-конец пептида позволяет получить молекулу с требуемыми для конкретной цели свойствами – мечения радиоизотопом для радионуклидной диагностики, цитотоксической группы для таргетного лечения и др. [37, 38].

Благодаря своим уникальным свойствам молекулы аффибоди представляют большой интерес для диагностической и клинической медицины, а также перспективны для использования в различных биомедицинских областях (рис. 1).

Так, активно изучаются возможности использования связанных с флуоресцентными фрагментами молекул аффибоди для биолюминесцентной визуализации злокачественных образований, основными преимуществами которой являются высокая чувствительность, отсутствие токсичности и необходимости выполнения инвазивных мероприятий, а также низкая стоимость [39].

Молекулы аффибоди могут использоваться также в качестве барьера между взаимодействующими белками, обеспечивая новый метод лечения заболеваний, вызванных этими взаимодействиями. Примером могут служить вирусные заболевания. Белки-спайки вируса являются важными мишениями для разработки вакцин и противовирусных препаратов. Например, показана высокая специфичность и аффинность молекулы аффибоди к белку RBMFP (продукт, синтезированный из белка SARS-CoV-2), при этом взаимодействие молекулы аффибоди с рецепторсвязывающим фрагментом RBM (Receptor Binding Motif) приводит к нейтрализации псевдовирусной инфекции SARS-CoV-2 [40].

Конъюгаты молекул аффибоди с различными типами наночастиц рассматривают как перспективные агенты для терапии и визуализации злокачественных образований [41]. Например, конъюгат аффибоди с контрастным агентом nanobullbe используется для связывания HER2 и IR783 и разработки метода ультразвуковой детекции HER2-положительного рака молочной железы [42]. Изучается возможность терапевтического воздействия высококо-аффинных зондов Gd@C-dots-Cys-ZEGFR:1907 к EGFR в терапии немелкоклеточного рака легкого и PFH/AGM-CBA/HSV-TK/липосомы (PAHL)-аффибоди в терапии HER2-позитивного рака молочной железы [43, 44].

Особое значение имеет разработка таргетных препаратов на основе аффибоди. Так, в 2022 году была начата III фаза клинического исследования препарата Izokibep® – ингибитора IL-17, используемого при некоторых комплемент-зависимых заболеваниях: псoriатического артрита,uveита, болезни Бехтерева, суппуративного гидраденита и др. [45, 46].

### Аффибоди для таргетной радионуклидной диагностики злокачественных образований

Большая часть исследований посвящена возможности использования аффибоди в качестве основы радиофармацевтических препаратов для таргетной визуализации злокачественных образований различной локализации. Важным для таргетной радионуклидной диагностики злокачественных новообразований является выбор визуализирующего метода, что обусловлено уникальными характеристиками каждого радиоизотопа, среди которых можно выделить период полураспада ( $T_{1/2}$ ), тип излучения (позитронное или гамма-излучение), способ получения (генератор или циклотрон) [47, 48]. В настоящее время для детекции излучения используются однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронная эмис-

**Таблица 1.** Радиоизотопы для радионуклидной диагностики с использованием ПЭТ или ОФЭКТ

| Радиоизотоп              | $T_{1/2}$ | Тип излучения                    | Способ получения |
|--------------------------|-----------|----------------------------------|------------------|
| $^{68}\text{Ga}$         | 68 мин    | $\beta^+$ , $\gamma$             | Генератор        |
| $^{99\text{m}}\text{Tc}$ | 6.02 ч    | $\gamma$                         | Генератор        |
| $^{18}\text{F}$          | 109.8 мин | $\beta^+$                        | Циклотрон        |
| $^{66}\text{Ga}$         | 9.9 ч     | $\beta^+$ , $\gamma$             | Циклотрон        |
| $^{64}\text{Cu}$         | 12.7 ч    | $\beta^+$ , $\beta^-$ , $\gamma$ | Циклотрон        |
| $^{188}\text{Re}$        | 17 ч      | $\beta^+$ , $\gamma$             | Генератор        |
| $^{89}\text{Zr}$         | 78.4 ч    | $\beta^+$                        | Циклотрон        |
| $^{111}\text{In}$        | 2.81 дня  | $\gamma$                         | Циклотрон        |
| $^{177}\text{Lu}$        | 6.7 дней  | $\beta^-$ , $\gamma$             | Циклотрон        |
| $^{125}\text{I}$         | 60 дней   | $\gamma$                         | Циклотрон        |
| $^{57}\text{Co}$         | 271.8 сут | $\gamma$                         | Циклотрон        |

сионная томография (ПЭТ), выбор которых зависит от применяемого в составе РФП изотопа (табл. 1). В настоящее время наиболее распространеными радионуклидами, используемыми с молекулами аффибоди, являются  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 68$  мин),  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $T_{1/2} = 6.02$  ч),  $^{18}\text{F}$  ( $T_{1/2} = 109.8$  мин) и т.д., а в качестве долгоживущих радионуклидов используются  $^{66}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 9.9$  ч),  $^{64}\text{Cu}$  ( $T_{1/2} = 12.7$  ч),  $^{188}\text{Re}$  ( $T_{1/2} = 17$  ч),  $^{89}\text{Zr}$  ( $T_{1/2} = 78.4$  ч),  $^{111}\text{In}$  ( $T_{1/2} = 2.81$  дня),  $^{177}\text{Lu}$  ( $T_{1/2} = 6.7$  дней),  $^{125}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 60$  дней),  $^{57}\text{Co}$  ( $T_{1/2} = 271.8$  сут) [49].

Радиоконъюгаты синтезируют к рецепторам, которые сверхэкспрессируются на поверхности опухолевых клеток при многих злокачественных патологиях и не только вовлечены в патогенез ЗНО, но и являются дополнительной терапевтической опцией у онкобольных. Так, в настоящее время проводятся доклинические исследования радиоконъюгатов к лиганду рецептора программируемой гибели клеток PD-L1. Этот рецептор является трансмембранным белком, регулирующим клеточный иммунный ответ, а экспрессия PD-L1 опухолевыми клетками или клетками микроокружения опухоли приводит к ингибированию клеточного иммунного ответа. Благодаря этому опухолевые клетки избегают апоптоза, связанного с цитотоксическим действием Т-лимфоцитов. Экспрессия PD-L1 обнаружена во многих опухолях, в том числе в меланоме, раке легкого, молочной железы, мочевого пузыря, поджелудочной железы, яичника [50–52].

Так, Liang и соавт. [53] оценивали фармакокинетику препарата [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-PDA-аффибоди, профиль его токсичности, а также возможность визуализации *in vivo* PD-L1-позитивных опухолей путем проведения ОФЭКТ через 30, 60 и 120 мин после инъекции. Отмечено достаточно быстрое (через 30 мин)

накопление РФП в опухоли, однако, с учетом общего распределения препарата, оптимальным для визуализации был интервал 1–2 ч. К недостаткам данного препарата относятся низкое разрешение ОФЭКТ, высокое накопление препарата в почках, а также в щитовидной железе и в желудочно-кишечном тракте, что обусловлено связыванием неконъюгированного оксида технеция-99м.

Другой перспективной мишенью для таргетной визуализации является рецептор B7-Н3 (CD276) – трансмембранный белок из семейства молекул контрольных точек, обладающий коактивирующими или коингирующими действием в отношении Т-лимфоцитов. В нормальных тканях белок экспрессируется на достаточно низком уровне, однако в некоторых опухолях отмечена его сверхэкспрессия [54]. К таким опухолям относятся рак предстательной железы, почечно-клеточный и уротериальный рак, рак яичника и др. В ткани опухоли этот белок обладает проонкогенным действием за счет ингибиции противоопухолевого иммунного ответа. В связи с активным развитием иммунотерапии этот рецептор рассматривается как потенциальная мишень, что делает актуальной разработку специфической диагностики сверхэкспрессии B7-Н3 в ткани опухоли [55].

Oroujeni и соавт. [56] изучали препарат  $[^{99m}\text{Tc}]$ -Tc-AC12-GGGC на клеточных линиях рака яичника и молочной железы. В качестве группы отрицательного контроля они использовали клеточную линию лимфомы Ramos, не экспрессирующую B7-Н3. Накопление препарата B7-Н3-позитивными клетками ксеногraftов было в 6 раз выше, чем в группе контроля. Однако обнаружено низкое абсолютное значение накопления препарата в опухоли. По результатам ОФЭКТ через 4 ч после инъекции РФП наблюдалась визуализация ксенотрансплантированной B7-Н3-положительной опухоли, в то время как в группе отрицательного контроля опухоль не визуализировалась. Высокое накопление  $[^{99m}\text{Tc}]$ -Tc-AC12-GGGC отмечено также в таких тканях, как почки и печень.

Oroujeni и соавт. [57] изучали также возможность улучшения детекции сверхэкспрессии B7-Н3 с радиофармацевтическим препаратом  $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-AC12-GGGC путем повышения аффинности молекулы аффибоди. С помощью фагового дисплея получили три дочерние молекулы, которые впоследствии пометили технецием-99м и наряду с оригинальной молекулой AC12 исследовали на мышиных моделях. В итоге была выделена молекула SYNT-179, обладающая лучшими характеристиками: более высоким накоплением опухолью, низким – нормальными тканями с улучшением соотношения опухоль/орган,

а также более низким накоплением РФП печенью. Показано, что процесс созревания аффинности молекул приводил к улучшению показателей биораспределения и визуализации, а оптимизированный белок аффибоди обладал улучшенными характеристиками для таргетной диагностики сверхэкспрессии B7-Н3.

В доклиническом исследовании Cai и соавт. [58] изучали возможность применения тримерной молекулы аффибоди, меченной  $[^{68}\text{Ga}]$ [ $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-Z<sub>TRI</sub>], для ПЭТ-диагностики гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК).  $[^{68}\text{Ga}]$ [ $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-Z<sub>TRI</sub> обладает высокой аффинностью к рецептору тромбоцитарного фактора роста типа бета (PDGFR $\beta$ ), который экспрессируется на поверхности перицитов – клеток, расположенных в толще стенок мелких кровеносных сосудов. В нормальных кровеносных сосудах перициты покрыты интактным эндотелием, однако в опухоли архитектоника сосудистых стенок нарушена, вследствие чего образуются участки перицитов, не покрытые эндотелием, что делает PDGFR $\beta$  на их поверхности доступным для детекции [59]. Поэтому предположили, что PDGFR $\beta$  может служить потенциальным биомаркером ГЦК, которая относится к обильно васкуляризованным новообразованиям, соответственно, возможна сверхэкспрессия данного рецептора в ГЦК по сравнению с нормальной тканью печени.

На первом этапе валидировали PDGFR $\beta$  в качестве биомаркера ГЦК и обнаружили высокую аффинность тримера аффибоди Z<sub>TRI</sub> к PDGFR $\beta$ . Также по данным ПЭТ накопление  $[^{68}\text{Ga}]$ [ $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-Z<sub>TRI</sub> было прямо пропорционально экспрессии PDGFR $\beta$  опухолевыми клетками, соответственно, препарат активно накапливался в PDGFR $\beta$ -положительных клетках ГЦК лабораторных животных. При этом не выявлено накопления  $[^{68}\text{Ga}]$ [ $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-Z<sub>TRI</sub> здоровыми тканями печени. Таким образом, показан высокий потенциал радиофармацевтического препарата  $[^{68}\text{Ga}]$ [ $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-Z<sub>TRI</sub> для ПЭТ-диагностики ГЦК и перспективность его дальнейшего изучения и внедрения в клиническую практику.

### Аффибоди для выявления HER2-позитивных злокачественных образований

Одной из мишеней для таргетной терапии злокачественных заболеваний является рецептор эпидермального фактора роста человека типа 2 (HER2/neu) – тирозинкиназный рецептор, играющий важную роль в клеточной дифференцировке, пролиферации и апоптозе. Сверхэкспрессия HER2 чаще всего обусловлена амплификацией гена ERBB2 и встречается при раке молочной железы, желудка, поджелудочной железы, легкого, эндометрия, яич-

ника, мочевого пузыря, колоректальном раке и ряде других опухолевых локализаций [60].

Современные подходы к определению HER2-статуса включают методы ИГХ и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). Согласно критериям ASCO/CAP от 2023 года, экспрессия HER2/neu считается отрицательной при отсутствии окрашивания или со слабым, прерывистым мембранным окрашиванием (0 и 1+); положительной – при периферическом мембранным полном интенсивном окрашивании более 10% опухолевых клеток (3+). В сомнительных случаях (2+) результат будет подтверждаться амплификацией гена HER2 методом гибридизации *in situ* (FISH) с использованием ДНК-зонда ERBB2(17q12)/SE17 (Kreatech, США) [61].

В настоящее время внимание ученых направлено на изучение возможностей таргетной радионуклидной детекции с использованием аффибоди для оценки экспрессии рецептора HER2/neu при таких злокачественных новообразованиях, как рак желудка и рак яичников, что обусловлено особенностями их анатомического расположения и поисками дополнительных терапевтических опций при данных онкологических патологиях. Так, рак желудка часто диагностируется на поздних стадиях, когда хирургическое лечение не представляется возможным, что требует определения молекулярно-биологических параметров опухоли для выбора варианта системной терапии. Экспрессию HER2 обнаруживают в 17–20% случаев рака желудка, однако при этом наблюдается очень высокий уровень гетерогенности экспрессии HER2 (14–79% ИГХ и 23–54% ИГХ + FISH). Кроме того, HER2-статус опухоли может меняться в процессе анти-HER2-терапии, что вызывает трудности при оценке эффективности уже проводимого лечения, так как выполнение нескольких биопсий сопряжено с рисками осложнений и не всегда возможно [62, 63].

Нан и соавт. [64] изучали возможности таргетной детекции с использованием препарата [<sup>18</sup>F]AlF-NOTA-HER2, где HER2-положительной была клеточная линия NCI-N87, а HER2-отрицательной – MKN74. *In vitro* показано накопление изучаемого РФП в клетках, экспрессирующих HER2. *In vivo* [<sup>18</sup>F]AlF-NOTA-HER2 быстро накапливался HER2-положительными ксенографтами и быстро элиминировался из крови преимущественно почками. Среди нормальных тканей самое высокое накопление наблюдалось в костях и почках, что стало существенным недостатком данной молекулы, так как высокий уровень поглощенной радиоактивности требует проведения нефропротекции. При дополнительном сравнении препаратов [<sup>18</sup>F]AlF-NOTA-HER2 и <sup>68</sup>Ga-NOTA-HER2 обнаружено преимущество использо-

вания фтора-18 перед галлием-68, обусловленное более длительным периодом распада (109.8 против 67.7 мин соответственно), что давало больше времени для выполнения исследования. Кроме того, фтор-18 обладает меньшей длиной диффузии позитрона, что обеспечивает более высокое разрешение ПЭТ-визуализации.

Если говорить о раке яичников, то с этой патологией связаны многочисленные диагностические и терапевтические трудности, обусловленные высокой частотой рецидивов и отдаленным метастазированием, а также высоким процентом случаев, выявленных на поздней стадии заболевания [65, 66]. До недавнего времени анти-HER2-терапия при опухолях данной локализации не рассматривалась из-за отрицательного опыта использования трастузумаба. Однако с появлением конъюгатов моноклональных антител с цитостатиками исследования в этом направлении возобновились. Так, в исследовании DESTINY-PanTumor02, посвященном изучению эффективности терапии трастузумабом-дерукстеканом при различных солидных опухолях, сообщалось о частоте объективного ответа (ЧОО) у 63–64% пациентов с HER2-позитивным раком яичников, что делает перспективным определение HER2-статуса при данной онкопатологии [67].

Изучение возможности использования молекул аффибоди при раке яичников с применением препарата [<sup>99m</sup>Tc]Tc-(HE)<sub>3</sub>Z<sub>HER2:V2</sub>, проведенное Ни и соавт. [68], выявило высокую аккумуляцию соединения в опухолях, сверхэкспрессирующих HER2/neu, в то время как опухоли, негативные по экспрессии HER2/neu, препарат не накапливали. К недостаткам [<sup>99m</sup>Tc]Tc-(HE)<sub>3</sub>Z<sub>HER2:V2</sub>, обнаруженным в ходе исследования, относится его высокая аккумуляция почками, что потенциально может приводить к нефротоксичности. Однако предполагается, что в клинической практике этот недостаток может быть устранен путем повышенной гидратации пациентов.

### Аффибоди для диагностики HER2-позитивного рака молочной железы

Сверхэкспрессия рецептора HER2 встречается в 15–20% случаев рака молочной железы (РМЖ) и традиционно ассоциирована с более агрессивным течением и, как следствие, худшим прогнозом. Несмотря на это, использование таргетной анти-HER2-терапии позволило приблизить общую выживаемость пациентов с HER2-положительным РМЖ к прогнозически более благоприятным молекулярно-генетическим подтипам [69]. На сегодняшний день в клинической практике применяются такие препараты, как трастузумаб, пертузумаб, лапатиниб, а также препараты нового класса – конъюгаты

**Таблица 2.** Радиофармпрепараты на основе аффибоди, находящиеся на разных стадиях клинических и доклинических испытаний

| РФП   | Метод визуализации | Таргетный рецептор | Этап исследования     | Авторы, год                         |
|---|--------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| [ <sup>99m</sup> Tc]Tc-PDA-аффибоди                           | ОФЭКТ              | PD-L1              | Доклинический         | Liang et al., 2022 [53]             |
| [ <sup>99m</sup> Tc]Tc-AC12-GGGC                              | ОФЭКТ              | B7-H3              | Доклинический         | Oroujeni et al., 2022 [56]          |
| [ <sup>99m</sup> Tc]Tc-SYNT-179                               | ОФЭКТ              | B7-H3              | Доклинический         | Oroujeni et al., 2023 [57]          |
| [ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-Z <sub>TRI</sub>                   | ПЭТ                | PDGFR $\beta$      | Доклинический         | Cai et al., 2023 [58]               |
| [ <sup>18</sup> F]AlF-NOTA-HER2                               | ПЭТ                | HER2               | Доклинический         | Han et al., 2022 [64]               |
| [ <sup>99m</sup> Tc]Tc-(HE) <sub>3</sub> Z <sub>HER2-V2</sub> | ОФЭКТ              | HER2               | Доклинический         | Hu et al., 2024 [68]                |
| [ <sup>111</sup> In]In-ABY-002                                | ОФЭКТ              | HER2               | Клинический (I фаза)  | Baum et al., 2010 [72]              |
| [ <sup>68</sup> Ga]Ga-ABY-002                                 | ПЭТ                | HER2               | Клинический (I фаза)  | Baum et al., 2010 [72]              |
| [ <sup>111</sup> In]In-ABY-025                                | ОФЭКТ              | HER2               | Клинический (I фаза)  | Sörensen et al., 2014 [73]          |
| [ <sup>68</sup> Ga]Ga-ABY-025                                 | ПЭТ                | HER2               | Клинический (I фаза)  | Sörensen et al., 2016 [74]          |
| [ <sup>68</sup> Ga]Ga-NOTA-Mal-Cys-MZHer342                   | ПЭТ                | HER2               | Клинический (I фаза)  | Miao et al., 2022 [75]              |
| [ <sup>68</sup> Ga]Ga-ABY-025                                 | ПЭТ                | HER2               | Клинический (II фаза) | Alhuseinalkhudhur et al., 2023 [76] |
| [ <sup>68</sup> Ga]Ga-ABY-025                                 | ПЭТ                | HER2               | Клинический (II фаза) | Altena et al., 2024 [77]            |
| [ <sup>99m</sup> Tc]Tc-ZHER2:41071                            | ОФЭКТ              | HER2               | Клинический (I фаза)  | Bragina et al., 2023 [78]           |

моноклональных антител с цитостатиками (трастузумаб-эмтансин и трастузумаб-дерукстекан) [70, 71].

К настоящему времени проведен ряд испытаний, в которых аффибоди использовали в качестве таргетного агента для радионуклидной диагностики статуса HER2/neu у больных с операбельным, местно-распространенным и метастатическим раком молочной железы.

Первое клиническое исследование молекулы аффибоди ABY-002, меченной индием-111 и галлием-68, было проведено Baum и соавт. [72] в 2005 году с целью изучения безопасности, фармакокинетики и возможности визуализации опухолевых очагов у больных раком молочной железы. Было установлено, что препараты [<sup>111</sup>In]In-ABY-002 и [<sup>68</sup>Ga]Ga-ABY-002 быстро элиминировались из кровотока, что позволяло проводить ОФЭКТ и ПЭТ уже через 2–3 ч после инъекции. Выявлена также эффективность радионуклидной визуализации опухоли с использованием этих препаратов: у всех пациенток отмечалось накопление исследуемых соединений в HER2-положительных опухолях. Кроме того, в одном случае с помощью [<sup>68</sup>Ga]Ga-ABY-002 обнаружен метастаз опухоли в мышцу (квадрицепс), тогда как при ПЭТ с <sup>18</sup>F-ФДГ данное образование не обнаружили. Несмотря на полученные положительные результаты, препараты [<sup>111</sup>In]In-ABY-002 и [<sup>68</sup>Ga]Ga-ABY-002 имеют и недостатки, такие как высокое накопление в печени и почках, что существенно ограничивает визуализацию тканей в соответствующих областях; так, не удалось обнаружить метастатиче-

ское поражение печени у одной из пациенток и метастаз в надпочечник у другой.

Следующим этапом стало изучение молекулы аффибоди второго поколения (ABY-025). В исследование Sörensen и соавт. [73] вошли семь пациенток с метастатическим раком молочной железы: пять – с HER2-положительным и две – с HER2-отрицательным. Как и в исследовании с ABY-002, введение [<sup>111</sup>In]In-ABY-025 было безопасным и не сопровождалось нежелательными явлениями. По данным ОФЭКТ, помимо четкой визуализации HER2-положительных опухолей, наблюдалось слабое накопление изучаемого препарата в HER2-отрицательных очагах, что объяснялось присутствием определенного количества рецептора HER2 на поверхности опухолевых клеток. В ходе исследования были визуализированы метастатические очаги в печени, не выявленные при использовании молекулы ABY-002. Интересной особенностью проведенного анализа стало обнаружение метастаза опухоли в головной мозг, ранее не определяемого с помощью ПЭТ с <sup>18</sup>F-ФДГ, а также выявление HER2-отрицательного метастаза опухоли у больной с положительным HER2-статусом первичной опухоли молочной железы. Основным же выявленным недостатком стала невозможность определения метастатических узлов размером менее 1 см.

Поскольку причиной низкой визуализации малых опухолевых очагов могла быть низкая разрешающая способность ОФЭКТ, проведено исследование препарата [<sup>68</sup>Ga]Ga-ABY-025 с использованием ПЭТ.

Анализ 16 пациенток с метастатическим РМЖ, проведенный Sörensen и соавт. [74], показал хорошую визуализацию очагов небольшого размера, что позволяло обнаружить метастазы опухоли молочной железы в печени, костях, лимфоузлах, головном мозге и других органах. Кроме того, у двух пациенток после исследования с  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$  статус HER2 в первичной опухоли молочной железы изменили с отрицательного на положительный. При этом в большинстве случаев обнаружены различия в экспрессии HER2 в первичной опухоли и в метастатических очагах.

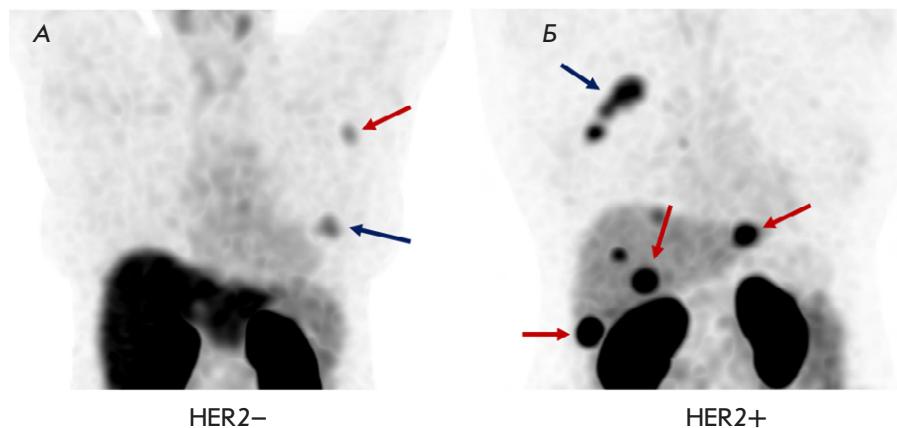
Miao и соавт. [75] изучали применение меченной галлием-68 молекулы аффибоди NOTA-Mal-Cys-MZHer342 в клиническом исследовании, в которое вошли 24 больные РМЖ. Важная особенность анализа состояла в проведении ПЭТ/КТ «по требованию» врачей-онкологов для решения трудных диагностических случаев: у шести пациенток с целью дифференцировки метастазов из двух синхронных РМЖ либо синхронного ЗНО другой локализации; у 13 пациенток – для определения HER2-статуса образований, недоступных для биопсии; у шести – для оценки HER2-статуса первичной опухоли и метастазов и у четырех – для оценки HER2-статуса в разных метастатических очагах. Во всех случаях сопоставляли SUVmax препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Mal-Cys-MZHer342}$  в опухолевых очагах с результатами иммуногистохимического исследования. Проведенный анализ показал, что использование препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Mal-Cys-MZHer342}$  позволяло определять сверхэкспрессию HER2 в опухолевой ткани со специфичностью 91.7% и отрицательную экспрессию HER2 со специфичностью 84.6%, изменение статуса HER2/neu с положительного на отрицательный отмечено у семи пациенток.

В исследование II фазы, проведенном Alhuseinalkhudhur и соавт. [76], вошли 19 пациенток с первичным РМЖ II–III стадии, которым запланировано проведение неoadъювантной терапии с двойной таргетной анти-HER2-блокадой, а также 21 пациентка с метастатическим раком молочной железы на фоне системной терапии. Предпосылкой к проведению этого анализа послужило предположение о том, что накопление  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$  может быть предиктором раннего ответа опухоли молочной железы на проводимую анти-HER2-терапию. Согласно дизайну исследования, пациенткам для оценки раннего метаболического ответа проводили ПЭТ/КТ с  $^{18}\text{F}$ -ФДГ до и после двух курсов химио/таргетной терапии и ПЭТ/КТ с  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$  до лечения.

Во всех случаях для оценки HER2-статуса на фоне проводимого лечения выполняли повторную биопсию одного из опухолевых очагов. Сравнение

результатов ПЭТ с  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$  и данных биопсии у 12 пациенток выявили несоответствие статуса HER2/neu, что было объяснено рядом причин. В число таких причин вошли трудности забора опухолевого материала (отрицательная экспрессия HER2 при положительном ПЭТ-исследовании чаще встречалась при заборе материала из печени или костей), межопухолевая гетерогенность, проблемы связывания препарата с HER2-рецепторами, что представляло особый интерес, так как положительный результат биопсии при низком накоплении  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$  был ассоциирован с худшим прогнозом в группе метастатического РМЖ. Кроме того, в ходе исследования выявлена обратная корреляция между числом предыдущих линий лечения и метаболическим ответом на текущую линию терапии: чем больше линий лечения получено, тем больший уровень накопления РФП требовался для метаболического ответа. Тем не менее, учитывая, что данная корреляция наблюдалась только в 30% случаев, а также то, что не обнаружено значимого соответствия ПЭТ с аффибоди и результатами биопсии, исследование III фазы с препаратом  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$  решили не проводить.

Altena и соавт. [77] провели первое клиническое исследование  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$ , направленное на возможность визуализации метастатического РМЖ с HER2-low-опухолями. В исследование вошли восемь пациенток с отрицательным (ИГХ 1+) и неопределенным (ИГХ 2+, FISH отрицательный) HER2-статусом, а также две пациентки с отсутствием экспрессии HER2 (ИГХ 0), ранее определенным по результатам биопсии первичной опухоли молочной железы. У одной пациентки отсутствие экспрессии HER2 сопровождалось минимальным накоплением  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$ , что коррелировало с результатами ИГХ-исследования. В другом случае накопление препарата было выше и не соответствовало статусу, определенному по данным биопсии HER2. Детальное изучение опухолевого очага выявило гетерогенность экспрессии HER2 с более высоким накоплением РФП по периферии и низким в центре. Таким образом, вероятнее всего, биопсийный материал был взят из «холодного» центрального участка, тогда как основной массив опухоли имел HER2-low-статус. Еще в двух случаях наблюдалось высокое накопление в ранее не верифицированных очагах, что могло бы свидетельствовать о сверхэкспрессии HER2 и потенциальной возможности назначения первой линии анти-HER2-терапии. В остальных восьми случаях отмечено пропорциональное HER2-статусу накопление  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$ , что соответствовало результатам многочисленных исследований данного РФП. Таким



**Рис. 2.** Накопление препарата  $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-ZHER2:41071 у больных раком молочной железы через 2 ч после его введения в дозе 1000 мкг: А – пациентка с HER2-отрицательным раком молочной железы (синей стрелкой указана опухоль молочной железы, красной – метастатический аксилярный лимфатический узел); Б – пациентка с HER2-положительным раком молочной железы (синей стрелкой указана опухоль молочной железы, красной – метастазы в печень)

образом, ПЭТ с применением  $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-ABY-025 может служить дополнительным методом диагностики для отбора пациентов, которым показана терапия конъюгатами моноклональных антител с цитостатиками.

Первое клиническое исследование молекул аффиди для таргетной радионуклидной диагностики HER2-позитивного рака молочной железы на территории Российской Федерации было проведено Bragina и соавт. [78] с использованием радиофармацевтического препарата  $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-ZHER2:41071. В исследование вошла 31 больная РМЖ, не получавшая какого-либо локального/системного лечения. У всех больных оценивали безопасность, переносимость, фармакокинетику препарата, а также сопоставляли накопление РФП опухолью с результатами ИГХ/FISH. Пациентки были поделены на три когорты в зависимости от введенной дозы  $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-ZHER2:41071: 500, 1000 и 1500 мкг. У всех больных отмечена хорошая переносимость РФП на всех этапах динамического наблюдения. При этом препарат в дозе 1000 мкг показал не только лучшие фармакокинетические параметры спустя 2 ч после введения, но и лучшие показатели разделения опухолей молочной железы в зависимости от статуса HER2/neu. Отличительной особенностью препарата  $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-ZHER2:41071 стало достаточно низкое его накопление нормальной тканью печени, что позволило визуализировать у одной из пациенток метастаз в печень, позднее подтвержденный данными компьютерной томографии с контрастированием. Клинический пример использования РФП представлен на рис. 2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественные опухоли уверенно занимают одни из лидирующих позиций по показателям заболеваемости и смертности по всему миру. В связи с этим

для определения оптимальной тактики локального и системного лечения особую роль играет диагностический этап, включающий изучение клинико-инструментальных, морфологических и молекулярных параметров [6]. Учитывая объективные сложности, обусловленные невозможностью одномоментной оценки распространенности опухолевого процесса, необходимостью многочисленных инвазивных манипуляций, дополнительными финансовыми затратами и порой субъективной оценкой полученных результатов, особенно актуальным представляется внедрение дополнительных методов обследования больных со злокачественными заболеваниями [7–10]. Многообещающим представляется развитие таргетной радионуклидной визуализации, совмещающей не только возможность анатомического стадирования, но и оценки молекулярного профиля опухолевых узлов, что в совокупности приводит к оптимизации обследования и сокращает количество инвазивных вмешательств [23, 24].

Как показано в данном обзоре, аффиди являются перспективными агентами для использования в различных областях биотехнологии и клинической медицины, в частности, для применения в биолюминесцентной ультразвуковой визуализации и создании противовирусных и таргетных терапевтических препаратов [38–40]. При этом к настоящему времени основное количество исследований посвящено изучению радиоконъюгатов аффиди с различными изотопами для таргетной визуализации злокачественных образований различной локализации. Проведенные доклинические испытания во всех случаях показали высокую аффинность аффиди к таким молекулярным мишениям, как рецептор эпидермального фактора роста типа 2 (HER2/neu) [59], лиганд рецептора программируемой гибели клеток (PD-L1) [52], рецептора B7-H3 (CD276) [58], рецептора тромбоцитарного фактора роста типа бета

(PDGFR $\beta$ ) и пр., а также возможность их опухолевой визуализации с использованием методов ПЭТ и ОФЭКТ.

Убедительно выглядят результаты многочисленных клинических испытаний аффибоди для HER2-позитивного рака молочной железы у человека, которые показали хорошую переносимость радиофармацевтических препаратов и отсутствие нежелательных явлений на всех этапах динамического наблюдения [71–75]. С клинических позиций особую важность имеет возможность анатомической визуализации опухолевых структур в молочной железе, регионарных лимфатических узлах, удаленных

органах и тканях, а также молекулярная визуализация экспрессии HER2/neu в выявленных структурах, сопоставимая с данными иммуногистохимического и FISH-анализа [76, 77]. Проведенный анализ однозначно свидетельствует о высокой перспективности использования альтернативных каркасных белков неиммуноглобулиновой природы, к которым относятся молекулы аффибоди, для клинической медицины. ●

Работы поддержаны грантом  
Министерства науки и высшего образования  
РФ № 075-15-2024-536.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–263. doi: 10.3322/caac.21834
- Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024.
- Cai A, Chen Y, Wang LS, et al. Depicting Biomarkers for HER2-Inhibitor Resistance: Implication for Therapy in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2024;16(15):2635. doi: 10.3390/cancers16152635
- Cai M, Song XL, Li XA, et al. Current therapy and drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Resist Updat.* 2023;68:100962. doi: 10.1016/j.drup.2023.100962
- Wang L, Wang X, Zhu X, et al. Drug resistance in ovarian cancer: from mechanism to clinical trial. *Mol Cancer.* 2024;23(1):66. doi: 10.1186/s12943-024-01967-3
- Passaro A, Al Bakir M, Hamilton EG, et al. Cancer biomarkers: Emerging trends and clinical implications for personalized treatment. *Cell.* 2024;187(7):1617–1635. doi: 10.1016/j.cell.2024.02.041
- Chae KJ, Hong H, Yoon SH, et al. Non-diagnostic Results of Percutaneous Transthoracic Needle Biopsy: A Meta-analysis. *Sci Rep.* 2019;9(1):12428. doi: 10.1038/s41598-019-48805-x
- Laurent F, Montaudon M, Latrabe V, Bégueret H. Percutaneous biopsy in lung cancer. *Eur J Radiol.* 2003;45(1):60–68. doi: 10.1016/s0720-048x(02)00286-3
- Kemeny MM, Busch-Devereaux E, Merriam LT, O’Hea BJ. Cancer surgery in the elderly. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2000;14(1):169–192. doi: 10.1016/s0889-8588(05)70283-5
- Nicolò E, Serafini MS, Munoz-Arcos L, et al. Real-time assessment of HER2 status in circulating tumor cells of breast cancer patients: Methods of detection and clinical implications. *J Liq Biopsy.* 2023;2:100117. doi: 10.1016/j.jlb.2023.100117
- Hou Y, Nitta H, Li Z. HER2 Intratumoral Heterogeneity in Breast Cancer, an Evolving Concept. *Cancers (Basel).* 2023;15(10):2664. doi: 10.3390/cancers15102664
- Hamilton E, Shastry M, Shiller SM, Ren R. Targeting HER2 heterogeneity in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2021;100:102286. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102286
- Laprovitera N, Rieffoli M, Ambrosini E, et al. Cancer of Unknown Primary: Challenges and Progress in Clinical Management. *Cancers (Basel).* 2021;13(3):451. doi: 10.3390/cancers13030451
- Harms PW, Frankel TL, Moutafi M, et al. Multiplex Immunohistochemistry and Immunofluorescence: A Practical Update for Pathologists. *Mod Pathol.* 2023;36(7):100197. doi: 10.1016/j.modpat.2023.100197
- Lino-Silva LS, Gamboa-Domínguez A, Zúñiga-Tamayo D, López-Correa P. Interobserver variability in colorectal cancer and the 2016 ITBCC consensus. *Mod Pathol.* 2019;32(1):159–160. doi: 10.1038/s41379-018-0027-5
- Wu Q, Xu L. Challenges in HER2-low breast cancer identification, detection, and treatment. *Transl Breast Cancer Res.* 2024;5:3. doi: 10.21037/tbcr-23-48
- Rulten SL, Grose RP, Gatz SA, et al. The Future of Precision Oncology. *Int J Mol Sci.* 2023;24(16):12613. doi: 10.3390/ijms24162613
- Langbein T, Weber WA, Eiber M. Future of Theranostics: An Outlook on Precision Oncology in Nuclear Medicine. *J Nucl Med.* 2019;60(2):13S–19S. doi: 10.2967/jnumed.118.220566
- Idée JM, Louquet S, Ballet S, Corot C. Theranostics and contrast-agents for medical imaging: a pharmaceutical company viewpoint. *Quant Imaging Med Surg.* 2013;3(6):292–297. doi: 10.3978/j.issn.2223-4292.2013.12.06
- Klain M, Nappi C, Zampella E, et al. Ablation rate after radioactive iodine therapy in patients with differentiated thyroid cancer at intermediate or high risk of recurrence: a systematic review and a meta-analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2021;48(13):4437–4444. doi: 10.1007/s00259-021-05440-x
- Bauckneht M, Ciccarese C, Laodicella R, et al. Theranostics revolution in prostate cancer: Basics, clinical applications, open issues and future perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2024;124:102698. doi: 10.1016/j.ctrv.2024.102698
- Kasi PB, Mallela VR, Ambroziewicz F, Trailin A, Liška V, Hemminki K. Theranostics Nanomedicine Applications for Colorectal Cancer and Metastasis: Recent Advances. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):7922. doi: 10.3390/ijms24097922
- Song Y, Zou J, Castellanos EA, et al. Theranostics – a sure cure for cancer after 100 years? *Theranostics.* 2024;14(6):2464–2488. doi: 10.7150/thno.96675
- Burkett BJ, Bartlett DJ, McGarrah PW, et al. A Review of Theranostics: Perspectives on Emerging Approaches and Clinical Advancements. *Radiol Imaging Cancer.* 2023;5(4):e220157. doi: 10.1148/rycan.220157
- Bodei L, Herrmann K, Schöder H, et al. Radiotheranostics in oncology: current challenges and emerging opportunities. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(8):534–550. doi: 10.1038/s41571-022-00652-y

26. Wei Z, Li B, Wen X, et al. Engineered Antibodies as Cancer Radiotheranostics. *Adv Sci (Weinh)*. 2024;11(30):e2402361. doi: 10.1002/advs.202402361
27. Bragina OD, Chernov VI, Garbukov EYu, et al. Possibilities of radionuclide diagnostics of Her2-positive breast cancer using technetium-99m-labeled target molecules: the first experience of clinical use. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021;20(1):23-30. doi: 10.20538/1682-0363-2021-1-23-30
28. Tolmachev V, Vorobyeva A. Radionuclides in Diagnostics and Therapy of Malignant Tumors: New Development. *Cancers (Basel)*. 2022;14(2):297. doi: 10.3390/cancers14020297
29. Bragina OD, Deyev SM, Chernov VI, Tolmachev VM. The Evolution of Targeted Radionuclide Diagnosis of HER2-Positive Breast Cancer. *Acta Naturae*. 2022;14(2):4-15. doi: 10.32607/actanaturae.11611
30. Luo R, Liu H, Cheng Z. Protein scaffolds: antibody alternatives for cancer diagnosis and therapy. *RSC Chem Biol*. 2022;3(7):830-847. doi: 10.1039/d2cb00094f
31. Tolmachev V, Orlova A, Sørensen J. The emerging role of radionuclide molecular imaging of HER2 expression in breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2021;72:185-197. doi: 10.1016/j.semancer.2020.10.005
32. Shipunova VO, Deyev SM. Artificial Scaffold Polypeptides As an Efficient Tool for the Targeted Delivery of Nanostructures In Vitro and In Vivo. *Acta Naturae*. 2022;14(1):54-72. doi: 10.32607/actanaturae.11545
33. Liu J, Cui D, Jiang Y, et al. Selection and characterization of a novel affibody peptide and its application in a two-site ELISA for the detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein. *Int J Biol Macromol*. 2021;166:884-892. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.245
34. Zhu J, Kamara S, Cen D, et al. Correction: Generation of novel affibody molecules targeting the EBV LMP2A N-terminal domain with inhibiting effects on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Death Dis*. 2020;11(6):494. doi: 10.1038/s41419-020-2692-9
35. Liu S, Gao C, Tong Z, et al. A highly sensitive electrochemiluminescence method for abrin detection by a portable biosensor based on a screen-printed electrode with a phage display affibody as specific labeled probe. *Anal Bioanal Chem*. 2022;414(2):1095-1104. doi: 10.1007/s00216-021-03735-4
36. Barozzi A, Lavoie RA, Day KN, et al. Affibody-Binding Ligands. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3769. doi: 10.3390/ijms21113769
37. DiRusso CJ, Dashtiahangar M, Gilmore TD. Scaffold proteins as dynamic integrators of biological processes. *J Biol Chem*. 2022;298(12):102628. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102628
38. Ståhl S, Gräslund T, Eriksson Karlström A, et al. Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications. *Trends Biotechnol*. 2017;35(8):691-712. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.04.007
39. Hersh J, Yang YP, Roberts E, et al. Targeted Bioluminescent Imaging of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Using Nanocarrier-Complexed EGFR-Binding Affibody-Gaussia Luciferase Fusion Protein. *Pharmaceutics*. 2023;15(7):1976. doi: 10.3390/pharmaceutics15071976
40. Du W, Jiang P, Li Q, et al. Novel Affibody Molecules Specifically Bind to SARS-CoV-2 Spike Protein and Efficiently Neutralize Delta and Omicron Variants. *Microbiol Spectr*. 2023;11(1):e0356222. doi: 10.1128/spectrum.03562-22
41. Gabriele F, Palerma M, Ippoliti R, Angelucci F, Pitari G, Ardin M. Recent Advances on Affibody- and DARPin-Conjugated Nanomaterials in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10):8680. doi: 10.3390/ijms24108680
42. Cai W, Lv W, Meng L, Duan Y, Zhang L. The Combined Effect of Nanobubble-IR783-HPPH-Affibody Complex and Laser on HER2-Positive Breast Cancer. *Int J Nanomedicine*. 2023;18:339-351. doi: 10.2147/IJN.S387409
43. Wu Y, Li H, Yan Y, et al. Affibody-Modified Gd@C-Dots with Efficient Renal Clearance for Enhanced MRI of EGFR Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:4691-4703. doi: 10.2147/IJN.S244172
44. Zhou H, Liu H, Zhang Y, et al. «PFH/AGM-CBA/HSV-TK/LIPOSOME-Affibody»: Novel Targeted Nano Ultrasound Contrast Agents for Ultrasound Imaging and Inhibited the Growth of ErbB2-Overexpressing Gastric Cancer Cells. *Drug Des Devel Ther*. 2022;16:1515-1530. doi: 10.2147/DDDT.S351623
45. Pinto Salgueiro G, Yilmaz O, Nogueira M, Torres T. Interleukin-17 Inhibitors in the Treatment of Hidradenitis Suppurativa. *BioDrugs*. 2025;39(1):53-74. doi: 10.1007/s40259-024-00687-w
46. Kerschbaumer A, Smolen JS, Ferreira RJO, et al. Efficacy and safety of pharmacological treatment of psoriatic arthritis: a systematic literature research informing the 2023 update of the EULAR recommendations for the management of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2024;83(6):760-774. doi: 10.1136/ard-2024-225534
47. Ahmadzadehfar H, Seifert R, Afshar-Oromieh A, et al. Prostate Cancer Theranostics With <sup>177</sup>Lu-PSMA. *Semin Nucl Med*. 2024;54(4):581-590. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2024.02.007
48. Salih S, Alkatheeri A, Alomaim W, Elliyanti A. Radiopharmaceutical Treatments for Cancer Therapy, Radionuclides Characteristics, Applications, and Challenges. *Molecules*. 2022;27(16):5231. doi: 10.3390/molecules27165231
49. Zhang L, Zhang H. Recent advances of affibody molecules in biomedical applications. *Bioorg Med Chem*. 2024;113:117923. doi: 10.1016/j.bmc.2024.117923
50. Rouanne M, Radulescu C, Adam J, Allory Y. PD-L1 testing in urothelial bladder cancer: essentials of clinical practice. *World J Urol*. 2021;39(5):1345-1355. doi: 10.1007/s00345-020-03498-0
51. Mucileanu A, Chira R, Mircea PA. PD-1/PD-L1 expression in pancreatic cancer and its implication in novel therapies. *Med Pharm Rep*. 2021;94(4):402-410. doi: 10.15386/mpr-2116
52. Lin KX, Istl AC, Quan D, et al. PD-1 and PD-L1 inhibitors in cold colorectal cancer: challenges and strategies. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(12):3875-3893. doi: 10.1007/s00262-023-03520-5
53. Liang Z, Hu X, Hu H, et al. Novel small <sup>99m</sup>Tc-labeled affibody molecular probe for PD-L1 receptor imaging. *Front Oncol*. 2022;12:1017737. doi: 10.3389/fonc.2022.1017737
54. Zhao B, Li H, Xia Y, et al. Immune checkpoint of B7-H3 in cancer: from immunology to clinical immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):153. doi: 10.1186/s13045-022-01364-7
55. Getu AA, Tigabu A, Zhou M, et al. New frontiers in immune checkpoint B7-H3 (CD276) research and drug development. *Mol Cancer*. 2023;22(1):43. doi: 10.1186/s12943-023-01751-9
56. Oroujeni M, Bezverkhnia EA, Xu T, et al. Evaluation of an Affibody-Based Binder for Imaging of Immune Check-Point Molecule B7-H3. *Pharmaceutics*. 2022;14(9):1780. doi: 10.3390/pharmaceutics14091780
57. Oroujeni M, Bezverkhnia EA, Xu T, et al. Evaluation of affinity matured Affibody molecules for imaging of the immune checkpoint protein B7-H3. *Nucl Med Biol*. 2023;124-125:108384. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2023.108384
58. Cai H, Li Z, Shi Q, et al. Preclinical evaluation of <sup>68</sup>Ga-

- radiolabeled trimeric affibody for PDGFR $\beta$ -targeting PET imaging of hepatocellular carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2023;50(10):2952-2961. doi: 10.1007/s00259-023-06260-x
59. Papadopoulos N, Lennartsson J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Mol Aspects Med*. 2018;62:75-88. doi: 10.1016/j.mam.2017.11.007
60. Ivanova M, Porta FM, D'Ercole M, et al. Standardized pathology report for HER2 testing in compliance with 2023 ASCO/CAP updates and 2023 ESMO consensus statements on HER2-low breast cancer. *Virchows Arch*. 2024;484(1):3-14. doi: 10.1007/s00428-023-03656-w
61. Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2023;41(22):3867-3872. doi: 10.1200/JCO.22.02864
62. Giugliano F, Carnevale Schianca A, Corti C, et al. Unlocking the Resistance to Anti-HER2 Treatments in Breast Cancer: The Issue of HER2 Spatial Distribution. *Cancers (Basel)*. 2023;15(5):1385. doi: 10.3390/cancers15051385
63. Schrijver WAME, Suijkerbuijk KPM, van Gils CH, et al. Receptor Conversion in Distant Breast Cancer Metastases: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(6):568-580. doi: 10.1093/jnci/djx273
64. Han J, Chen Y, Zhao Y, et al. Pre-Clinical Study of the [ $^{18}\text{F}$ ]AlF-Labeled HER2 Affibody for Non-Invasive HER2 Detection in Gastric Cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:803005. doi: 10.3389/fmed.2022.803005
65. Stewart D, Cristea M. Antibody-drug conjugates for ovarian cancer: current clinical development. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2019;31(1):18-23. doi: 10.1097/GCO.0000000000000515
66. Luo H, Xu X, Ye M, et al. The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191972. doi: 10.1371/journal.pone.0191972
67. Murciano-Goroff YR, Suehnholz SP, Drilon A, Chakravarty D. Precision Oncology: 2023 in Review. *Cancer Discov*. 2023;13(12):2525-2531. doi: 10.1158/2159-8290.CD-23-1194
68. Hu X, Hu H, Li D, et al. Affibody-based molecular probe  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(HE)<sub>3</sub>Z<sub>HER2:V2</sub> for non-invasive HER2 detection in ovarian and breast cancer xenografts. *Open Med (Wars)*. 2024;19(1):20241027. doi: 10.1515/med-2024-1027
69. Swain SM, Shastry M, Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov*. 2023;22(2):101-126. doi: 10.1038/s41573-022-00579-0
70. Dowling GP, Keelan S, Toomey S, et al. Review of the status of neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer. *Front Oncol*. 2023;13:1066007. doi: 10.3389/fonc.2023.1066007
71. Zimmerman BS, Esteva FJ. Next-Generation HER2-Targeted Antibody-Drug Conjugates in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2024;16(4):800. doi: 10.3390/cancers16040800
72. Baum RP, Prasad V, Müller D, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic  $^{111}\text{In}$ - or  $^{68}\text{Ga}$ -labeled affibody molecules. *J Nucl Med*. 2010;51(6):892-897. doi: 10.2967/jnunmed.109.073239
73. Sörensen J, Sandberg D, Sandström M, et al. First-in-human molecular imaging of HER2 expression in breast cancer metastases using the  $^{111}\text{In}$ -ABY-025 affibody molecule. *J Nucl Med*. 2014;55(5):730-735. doi: 10.2967/jnunmed.113.131243
74. Sörensen J, Velikyan I, Sandberg D, et al. Measuring HER2-Receptor Expression In Metastatic Breast Cancer Using  $[^{68}\text{Ga}]$ ABY-025 Affibody PET/CT. *Theranostics*. 2016;6(2):262-271. doi: 10.7150/thno.13502
75. Miao H, Sun Y, Jin Y, et al. Application of a Novel  $^{68}\text{Ga}$ -HER2 Affibody PET/CT Imaging in Breast Cancer Patients. *Front Oncol*. 2022;12:894767. doi: 10.3389/fonc.2022.894767
76. Alhuseinalkhudhur A, Lindman H, Liss P, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Targeting  $[^{68}\text{Ga}]$  Ga-ABY-025 PET/CT Predicts Early Metabolic Response in Metastatic Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2023;64(9):1364-1370. doi: 10.2967/jnunmed.122.265364
77. Altena R, Burén SA, Blomgren A, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) PET Imaging of HER2-Low Breast Cancer with  $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-ABY-025: Results from a Pilot Study. *J Nucl Med*. 2024;65(5):700-707. doi: 10.2967/jnunmed.123.266847
78. Bragina O, Chernov V, Larkina M, et al. Phase I clinical evaluation of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled Affibody molecule for imaging HER2 expression in breast cancer. *Theranostics*. 2023;13(14):4858-4871. doi: 10.7150/thno.86770