

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ В РАЗРАБОТКЕ АФФИННЫХ И СПЕЦИФИЧНЫХ БЕЛОК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СИСТЕМ

Обзор

© 2024 Ш.Ш. Насаев¹, А.Р. Муканов¹, И.В. Мишкорец^{1,2},
И.И. Кузнецов¹, И.В. Лейбин³, В.А. Долгушева¹, Г.А. Павлюк¹,
А.Л. Манасян¹, А.В. Веселовский^{2*}

¹ООО «Кселари», отдел исследований и разработок, 121601 Москва, Россия

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: veselov@ibmh.msk.su

³Сколковский институт науки и технологий, 121205 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.04.2024

После доработки 12.06.2024

Принята к публикации 11.07.2024

Аффинные и специфические белок-связывающие системы находят широкое применение в различных областях, в частности, в диагностике заболеваний, в терапии как лекарственные препараты и средства их доставки, в научных исследованиях и др. Их разработка требует значительных временных и трудовых затрат. Поэтому в области разработки аффинных агентов активно используют компьютерные методы для их анализа и моделирования на разных этапах разработки. В обзоре описаны основные аффинные и специфические агенты, такие как моноклональные антитела и их фрагменты, антителомиметики, аптамеры и полимерные молекулярные отпечатки. Кратко описаны способы их получения, основные преимущества и недостатки. Отдельное внимание уделено методам молекулярного моделирования, используемым для анализа и разработки аффинных и специфических агентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антитела, антителомиметики, аптамеры, молекулярные отпечатки, молекулярное моделирование.

DOI: 10.31857/S0320972524080055 EDN: KDYYUE

ВВЕДЕНИЕ

С момента первого упоминания использования антител для распознавания белков в 1968 году наблюдался стремительный рост интереса к разработке аффинных и специфических систем для диагностики, а затем терапии и других областей [1]. В 70–80-е годы XX века были разработаны технологии получения моноклональных антител, проведены исследования структуры иммуноглобулинов, получены химерные, гуманизированные и,

позднее, полностью человеческие моноклональные антитела, в результате чего антитела стали одной из главных специфических белок-связывающих систем в современной биологии, медицине и других областях [2]. Антитела применяются в качестве иммобилизирующих и детектирующих реактивов в диагностике, лекарств и средств их доставки, способов маркировки и окрашивания, исследовательских инструментов и др. [3–5].

Тем не менее даже современные моноклональные антитела не лишены недостатков, из-за чего спектр их разнообразия и области применения всё ещё остаются ограниченными. Это способствовало развитию альтернативных систем, способных с высокой эффективностью и специфичностью связываться с белками.

Необходимость оптимизации этих подходов, а также требования к направленной и рацио-

Принятые сокращения: CDRs – Complementarity Determining Regions, варибельные петли; MIP – molecularly imprinted polymers, полимерные молекулярные отпечатки; SELEX – систематическая эволюция лиганда путём экспоненциального обогащения.

* Адресат для корреспонденции.

нальной разработке таких систем привели к широкому внедрению методов молекулярного моделирования на разных этапах их создания. Методы моделирования оказываются весьма эффективным способом исследования свойств аффинных белок-связывающих систем, а также способом повышения результативности и удешевления их разработки, улучшения параметров связывания и увеличения стабильности. Отдельные исследования показывают возможность рациональной разработки аффинных связывающих систем на основе структуры мишени. Данные методы используются на разных этапах создания белок-связывающих систем, начиная от этапа создания первичных библиотек мономеров и заканчивая этапами оптимизации систем и выяснения молекулярных механизмов связывания. При этом могут быть использованы как универсальные методы, такие как построение белков по гомологии, молекулярный докинг и молекулярная динамика, так и специализированные методы, оптимизированные для конкретного типа связывающих агентов.

В данном обзоре рассмотрены основные преимущества и недостатки известных белок-связывающих систем, основные экспериментальные подходы для их разработки и ограничения таких подходов. Отдельное внимание уделено применимости современных методов молекулярного моделирования к исследованию, оптимизации, рациональной разработке аффинных белок-связывающих систем как способа обхода ограничений экспериментальных подходов и оценке результатов, получающихся при моделировании.

БЕЛКОВЫЕ АФФИННЫЕ БЕЛОК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СИСТЕМЫ

Антитела: структура, способы получения и применение антител. Антитела являются глобулярными белками, которые состоят из 4 полипептидных цепей, двух лёгких (50–60 кДа) и двух тяжёлых (100–120 кДа), соединённых дисульфидными связями. Антигенсвязывающие свойства обеспечиваются переменным доменом, образованным фрагментом тяжёлой и лёгкой цепей (рис. 1, а). Переменный домен имеет консервативные зоны, отвечающие за поддержание структуры сайта связывания, и переменные петли, или CDRs (Complementarity Determining Regions), которые обеспечивают взаимодействие с антигеном (рис. 1, б). Антитела вырабатываются плазматическими клетками иммунной системы, а также являются компонентами рецепторов В-лимфоцитов [6].

К первому практическому использованию антител как аффинных и специфичных систем

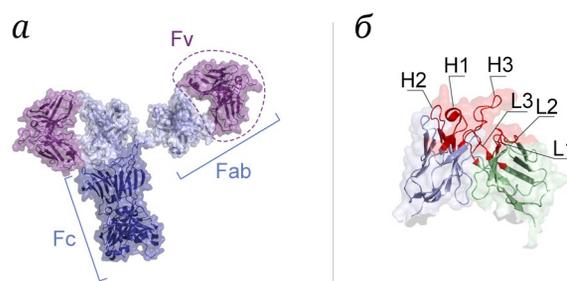


Рис. 1. Структура иммуноглобулина G (PDB: 1HZN) (а) и переменных петель (CDRs) в составе Fv-домена (б)

можно отнести применение Э. фон Берингом и С. Китасато в 1890 году сыворотки с поликлональными антителами для лечения дифтерии у животных. Антитела стали наиболее популярными антитоксинами, и поликлональные сыворотки используют по сей день. Огромным толчком в исследованиях и применении антител стало изобретение в 1975 году Ж. Келером и С. Мильштейном гибридной технологии получения моноклональных антител. Моноклональные антитела позволили создавать уникальные воспроизводимые методики выделения, определения наличия и концентрации белков, а также мечения клеток по их антигенному составу. Начиная с 1985 года моноклональные антитела стали использовать в лекарственной терапии. В настоящее время они являются основными аффинными и специфичными системами, связывающимися с белками [7].

Наиболее часто используемым методом разработки моноклональных антител является гибридная технология: метод слияния генетически модифицированных миеломных клеток с В-лимфоцитами, в результате которого получают клетки, способные к постоянному выделению антител, связывающих целевую молекулу белка. С точки зрения затрат на разработку и производство антител гибридная технология является слабоавтоматизируемой и ресурсозатратной, в том числе из-за необходимости постоянного поддержания жизнедеятельности клеточных культур в биореакторах, а также необходимости непрерывного контроля генетических изменений в процессе размножения клеток [8].

Более универсальным и менее затратным является альтернативный способ получения антител с использованием фаговых дисплеев, когда ген переменного домена антител встраивается в геном бактериофага (например, M13), после чего производится заражение бактерии, и фрагмент антитела экспрессируется как компонент оболочки вируса. Связываться с антигеном способны только те бактериофаги, в оболочке которых располагается фрагмент антитела, аффинный к белку-мишени. С помощью смеси нецелевых белков

удаляются бактериофаги, которые показывают низкую специфичность. По этим двум принципам происходит отбор искомого варибельного домена, который впоследствии может подвергаться модификациям для увеличения аффинности и специфичности путём направленного мутагенеза и повторного отбора [9].

Несмотря на существование двух методов получения моноклональных антител, экономические затраты на разработку и, что более значимо, на производство антител являются существенными, так как в обоих случаях необходимо использование биореакторов. В связи с этим цены на антитела могут быть высокими, а их применение в различных сферах – ограниченным. В силу высокой сложности контроля воспроизводимости от партии к партии такие характеристики связывания, как аффинность, специфичность и устойчивость, часто отличаются от заявленных производителем [10].

Методы молекулярного моделирования в разработке и исследовании антител. В целях оптимизации структуры и направленной разработки антител для повышения аффинности, специфичности и улучшения других свойств в последние годы активно используются методы молекулярного моделирования.

Моделирование структуры антител. В структуре варибельного домена антител пять из шести гиперварибельных участков CDRs имеют ограниченное количество возможных конформаций, то есть имеют структуру, незначительно различающуюся (RMSD около 0,7 Å) между различными по специфичности и аффинности антителами [11, 12]. Анализ известных пространственных структур антител показал, что существует восемь основных шаблонов конформаций их варибельной части: два для структуры лёгкой и тяжёлой цепей, пять для гиперварибельных петель в составе CDRs (L1, L2, L3, H1, H2), и один используется как основа для моделирования H3-петли, которая может значительно варьировать между различными антителами (рис. 1, б). На основе комбинирования этих основных конформаций петель могут быть спрогнозированы структуры большинства варибельных фрагментов антител. Для пяти из шести петель в составе CDRs моделирование в основном происходит путём построения по гомологии. Основной проблемой является моделирование петли H3 и относительной ориентации цепей H и L. Поскольку H3 является частью интерфейса HL, моделирование обеих этих областей является взаимозависимым [13]. Петля H3 строится с использованием методов *ab initio*. В этих методах проводится или поиск похожих петель в известных пространственных структурах белков, или последовательное построение этой петли путём

добавления аминокислотных остатков с последующей оптимизацией структуры построенной петли методами молекулярной механики и динамики. Предложены методы, основанные на стохастических подходах, таких как алгоритм Монте-Карло, в которых создаётся набор различных геометрий, после чего происходит отбор наиболее стабильных с помощью оценки энергии. Далее, происходит минимизация энергии структуры с помощью оптимизации геометрии и выбирается наиболее энергетически выгодная структура [14]. Консервативные части антитела строятся по гомологии с известными пространственными структурами антител с помощью таких программ, как Modeller, I-TASSER и Rosetta [15–18]. На основе данных подходов были разработаны несколько программных продуктов, как коммерческих (продукты компаний «Schrödinger Inc.», «Chemical Computer Group» и «Accelrys Inc.»), так и свободно доступных (PIGS, WAM, SAbPred) [17, 19–21]. Комбинирование методов построения по гомологии и *ab initio* лежит в основе пакета программ RosettaAntibody, который показывал высокую точность соответствия смоделированных и определённых в эксперименте структур [22, 23].

Наиболее значимым следствием разработанных методов для моделирования антигенсвязывающих участков антител стала возможность изменения их аффинности путём внесения точечных замен и быстрой оценки связывания в экспериментах *in silico* [24, 25]. В работе Kiyoshi et al. было смоделировано внесение 1178 точечных мутаций, которые включали поочередную замену каждого из 62 аминокислотных остатков в составе CDRs на соответствующие 19 остатков в структуре антитела 11K2, связывающегося с хемокином MCP-1. В результате отбора *in silico* было показано, что двенадцать из данных замен приводят к повышению аффинности антитела. В последующей проверке с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса было подтверждено, что при внесении пяти из двенадцати отобранных замен аффинность увеличивается. Для одного из мутантов было показано увеличение аффинности в 4,7 раза по сравнению с антителом дикого типа. Авторы данного исследования отметили, что наибольшее значение для повышения аффинности антител имели заряженные остатки во фрагменте лёгкой цепи варибельного домена [25]. Эти методы показали эффективность в выявлении аминокислотных остатков, наиболее важных для связывания.

Моделирование структуры комплекса антиген-антитело. В упомянутой выше работе улучшение было проведено для антитела, в случае которого структура комплекса антитело-антиген была известна [25]. На практике для большинства новых или доступных на рынке

антител пространственная структура комплекса неизвестна [26]. В связи с этим большое значение имеет возможность правильного определения сайта связывания антитела на поверхности белка-мишени. Для решения этой задачи был разработан ряд экспериментальных и компьютерных подходов [27]. В методах *in silico* в качестве входных данных используются как пространственные структуры белков-мишеней, так и их аминокислотные последовательности. Предсказание линейных эпитопов по последовательностям показывает хорошие результаты, но среди всех эпитопов они составляют только 10% [27, 28]. Попытки предсказания конформационных эпитопов при анализе аминокислотных последовательностей показали низкую эффективность, так как трудно учесть пространственное взаимодействие различных участков первичной последовательности белков [29–31]. Поэтому наиболее распространённым является метод высокомолекулярного (белок-белкового) докинга, когда два белка на основе оценки электростатических и стерических соответствий стыкуются между собой в жёсткой форме. Так как в процессе такого взаимодействия должна происходить взаимно индуцированная подстройка поверхностей, жёсткий белок-белковый докинг оказывается малоинформативным. В связи с этим были разработаны подходы к моделированию белковых комплексов с быстрой взаимной оптимизацией геометрии [32, 33]. RosettaFold производит быстрое подстраивание геометрии путём минимизации энергии с помощью алгоритма Монте-Карло. На основе метода RosettaFold и RosettaAntibody был разработан алгоритм SnugDock, специально созданный под моделирование комплексов антитело-антиген и способный производить быструю оптимизацию Монте-Карло для получения более качественных моделей [34]. Было отмечено, что близкий к нативному комплекс антитело-антиген обычно оказывается значительно более энергетически выгодным, в связи с чем возникает довольно явный глобальный энергетический минимум для моделируемой системы и отбор происходит более эффективно [33, 35].

Тем не менее явным недостатком данного подхода остаётся его низкая точность. В моделировании комплексов этап оптимизации является приближённым, а функция оценки энергии – упрощённой, что приводит к низкой корреляции между экспериментально полученными данными и предсказаниями [36]. Поэтому результаты докинга часто дополнительно оценивают методом молекулярной динамики. Так, например, в работе по моделированию комплексов антител с бета-амилоидом после проведения докинга крениума (гуманизованное антитело против 1–40 и 1–42 бета-амилоида, которое разрабатывалось в

качестве лекарства от болезни Альцгеймера) на поверхность бета-амилоида было получено около 200 моделей комплексов, которые были разделены на восемь кластеров. Далее, для представителей кластеров проводилось несколько этапов молекулярной динамики длительностью 200 нс для оптимизации структуры комплекса, анализа формирования связей и расчёта энергии взаимодействия. Было обнаружено два комплекса, которые остаются стабильными и объясняют экспериментальные данные [35].

Метод Монте-Карло является стохастическим, и его предсказательная сила зависит от количества итераций, при увеличении числа которых растёт количество возможных вариантов положений, в результате чего возникает трудно решаемая проблема отбора наиболее вероятных структур. Для этих задач применяются специальные алгоритмы увеличения конформационной выборки для уменьшения случайных энергетических флуктуаций, переоценки энергий комплекса с помощью повышения значимости учёта электростатической энергии и энергии десольватации, а также кластеризация комплексов. Примерами программ, где были реализованы данные алгоритмы, являются FiberDock, ZRANK, pyDock [37–40].

Помимо методов, основанных на Монте-Карло, были разработаны подходы прямого поиска взаимодействующих поверхностей за счёт быстрого преобразования Фурье. Алгоритм может производить поиск соответствий между белковыми поверхностями, переводя их в частотное представление. Таким образом, находится гораздо меньше возможных мест связывания и взаимных конформаций за значительно меньшее время, в том числе благодаря возможности вычислений на графических процессорах. Однако наиболее значимым фактором в данном алгоритме является не физико-химическое соответствие, а геометрическое, что существенно ограничивает метод и требует дополнительных этапов моделирования [41].

Существуют также методы, основанные на предсказании энергии взаимодействия между двумя белками, в том числе комплекса антитело-антиген, которые оптимизированы для поиска связи между структурой взаимодействующих поверхностей и экспериментально определённой аффинностью. Недавно была показана возможность использования метода пертурбации свободной энергии (free energy perturbation, FEP; метод, основанный на вычислении разницы в изменении свободной энергии комплекса при конвертации одной молекулы лиганда (или аминокислотного остатка) в другую за счёт мелких изменений в структуре лиганда с оптимизацией каждой промежуточной структуры комплекса в процессе молекулярной динамики) для предсказания

влияния точечных мутаций на аффинность и стабильность комплекса антиген–антитело [42]. Была также разработана программа DDMut-PPI, которая основана на методах глубокого обучения и позволяет предсказывать изменение свободной энергии при связывании двух белков с большей производительностью [43]. С увеличением количества структур комплексов в базе данных PDB также стала возможной разработка частотных матриц, в которых было определено, что полярные и заряженные аминокислотные остатки на границе взаимодействия являются предпочтительными, и по данному критерию может производиться быстрый отбор потенциальных областей взаимодействия. Таким образом, может происходить дополнительный отбор комплексов по их физико-химическим свойствам, что значительно увеличивает вероятность обнаружения правильной геометрии комплекса [44, 45].

Были разработаны и более универсальные комбинированные подходы. Так, построение структуры антитела по гомологии, оптимизация комплекса и применение сложных физико-химических оценочных функций было использовано в разработанной программе OptMAVEp-2.0 в целях *de novo* моделирования переменных фрагментов антител для взаимодействия с конкретным эпитопом на поверхности белкового антигена. В данном методе реализован как белок-белковый докинг, оптимизация позы, оптимизация положения боковых радикалов, так и подбор последовательности, построение статистических матриц и другое [46]. В этом методе был использован подход по имитации природного процесса V(D)J рекомбинации генов путём конструирования антител из структурных блоков MAP (modular Ab parts) с последующей оптимизацией структуры для увеличения аффинности. С его помощью было сконструировано пять антител для пептидов, которые были протестированы экспериментально, показали правильную укладку белковой глобулы и стабильность в растворе. Три из них имели аффинность в наномолярном диапазоне [47]. Этот подход был также использован для конструирования двух антител для связывания эпитопов на оболочечном белке вируса Зика [46].

Интересной перспективой развития методов моделирования антител является возможность полного *de novo* конструирования антител против заданного эпитопа на основе вычислительных моделей. Был разработан подход, в рамках которого была собрана библиотека коротких последовательностей-затравок, способных связываться с участками поверхности белка-мишени. Данные последовательности докировались на поверхность белка по методу «горячих точек» (hot spots, метод докирования библиотеки коротких фрагментов

и выбора структур, вносящих наибольший вклад во взаимодействие с поверхностью белка; также «горячими точками» часто называют аминокислотные остатки, вносящие существенный вклад в энергию связывания), затем подбирались общий каркас антитела, способный связать полученные участки между собой. С использованием достаточно разнородной библиотеки подобный подход может быть использован для направленной разработки антител под целевые эпитопы, однако в оригинальной работе его применение было ограничено эпитопами, для которых уже известны структуры комплексов с антителом [48].

Комбинирование методов анализа статистики взаимодействия комплексов и построения по гомологии особенно применимо в методах моделирования, основанных на глубоком обучении. Основанная на модели трансформера нейронная сеть AlphaFold2, а также её дополнение в виде AlphaFold-Multimer были применены для моделирования комплексов антитело–антиген из первичной последовательности. Тем не менее результат моделирования всё ещё оставался на уровне 30% успешного воспроизведения геометрии комплекса, полученного из экспериментов [49].

Различные модели глубокого обучения, основанные на графовых нейронных сетях, языковых моделях и др., применялись для моделирования антител под конкретный эпитоп [50–52]. Тем не менее ограничениями данных методов оставались обучающие выборки, полученные из PDB, в связи с чем они рассматривали очень ограниченное количество как структур эпитопов, так и структур самих антигенсвязывающих доменов.

Методы, основанные на глубоком обучении, в настоящее время активно развиваются. Они хорошо аппроксимируют скрытые закономерности, поэтому могут показывать высокую точность построения моделей, превосходя методы построения по гомологии, такие как Modeller и I-Tasser [53]. Однако для качественного обучения таких систем требуется большая обучающая выборка, что пока труднодостижимо. Малое количество экспериментально определённых структур обуславливает то, что данные методы показывают всё ещё не очень высокую точность [49].

Схема используемых методов разработки и оптимизации моноклональных антител показана на рис. 2.

В дополнение к методам конструирования структуры антитела и его комплекса с антигеном были разработаны разнообразные подходы для предсказания склонности антител к агрегации, иммуногенности антител, фармакокинетического клиренса [54–56].

Несмотря на значительное количество разнообразных методов моделирования взаимодей-

Моделирование переменных доменов Моделирование комплекса *de novo* конструирование переменных доменов

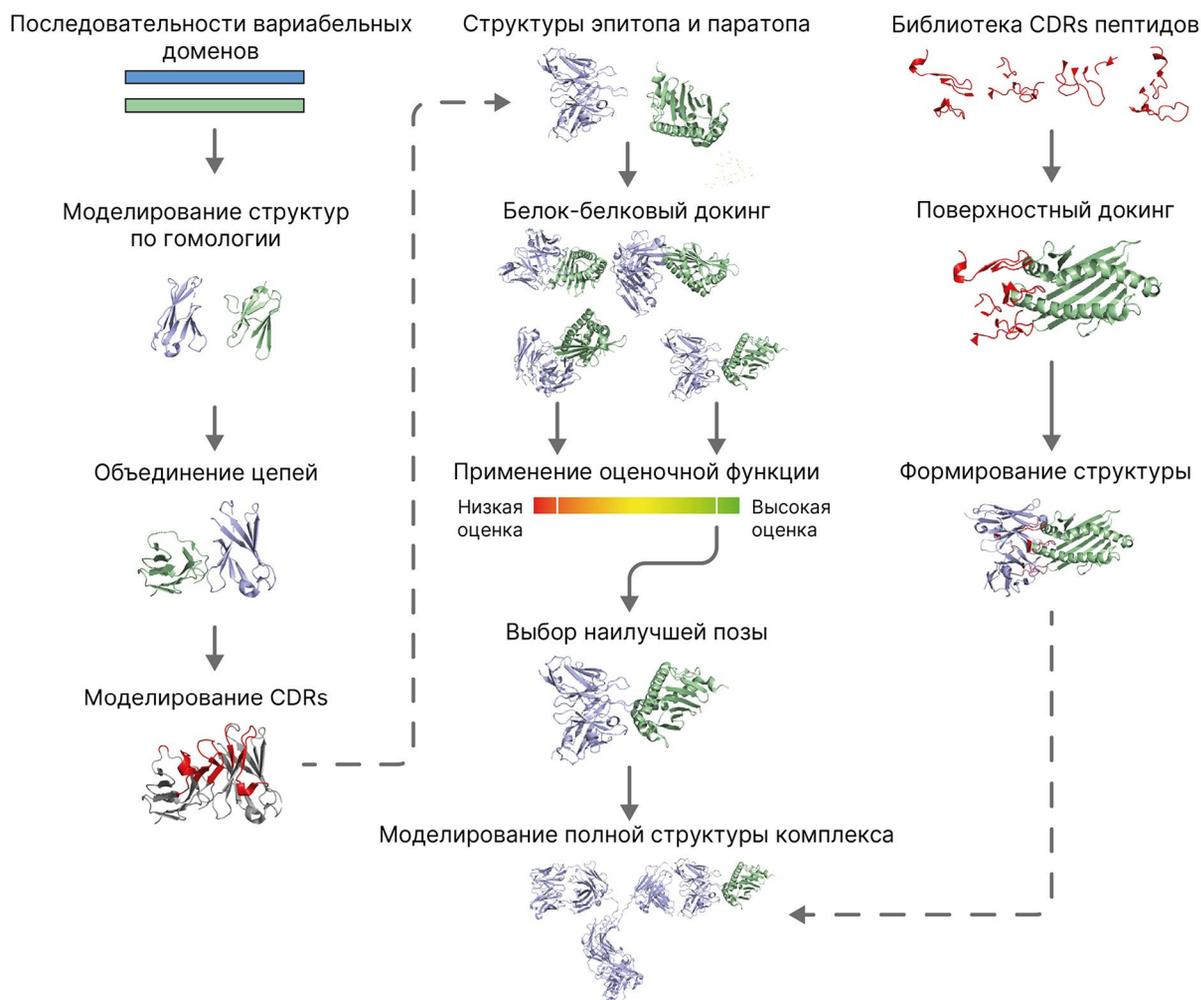


Рис. 2. Стратегии применения методов молекулярного моделирования в разработке и оптимизации моноклональных антител

ствия комплексов антитело–антиген, большинство из них имеют серьёзное ограничение, связанное с отсутствием учёта растворителя, играющего важную роль во взаимодействии антител с антигенами. Для решения этой проблемы наиболее эффективным методом всё ещё остаётся длительная молекулярная динамика в условиях явного растворителя, требующая большого количества вычислений. Возможным вариантом решения этой проблемы может быть применение методов ускоренной динамики, в том числе основанных на методах глубокого обучения [57].

Фрагменты антител. Структура и методы разработки фрагментов антител. Как отмечалось выше, разработка и производство антител является дорогостоящим процессом, требующим постоянного контроля. В связывании антител с мишенью задействован только переменный домен антитела, поэтому были разработаны ук-

роченные варианты антител, сохраняющие способность связываться с мишенью. С помощью методов генной инженерии были получены разнообразные формы белок-связывающих фрагментов антител, такие как одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), отдельный антигенсвязывающий фрагмент (Fab'), минитела, нанотела и др. [58–60]. Сравнение структуры антител и их гомологов показано на рис. 3.

В основе разработки каждого из перечисленных производных моноклональных антител лежат технологии гибридомы или фагового дисплея, позволяющие получать аффинные и специфичные системы и увеличивать аффинность в процессе отбора [61, 62]. С помощью методов генной инженерии из участков генов вырезаются области, кодирующие стабильные домены антитела, отвечающие за удержание структуры и связывание с Fc-рецепторами иммунной системы,

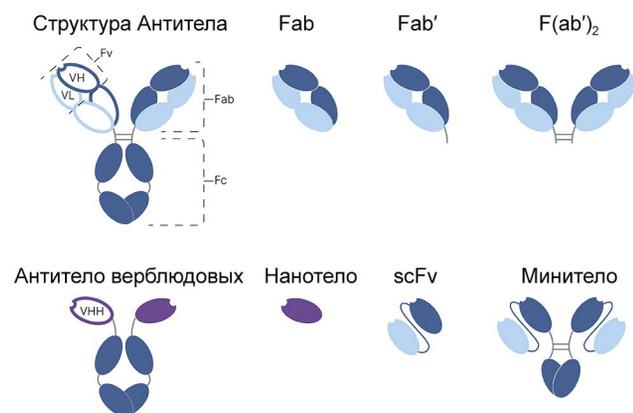


Рис. 3. Сравнение структуры антител и примеров фрагментов антител

и создаются линкеры, соединяющие отдельные участки лёгкой и тяжёлой цепи переменного фрагмента иммуноглобулинов.

В случае нанотел основой являются иммуноглобулины, которые имеют только тяжёлую цепь в переменном домене, за счёт чего антигенсвязывающий участок оказывается более простым. Подобные антитела встречаются у животных, относящихся к семейству верблюдовых (*Camelidae*). С уменьшением размера структуры уменьшается стоимость и сложность её производства, возрастает проницаемость в ткани, что особенно важно для терапевтического применения данных систем, но при этом существенно снижается стабильность антигенсвязывающего участка, что влечёт за собой ухудшение параметров связывания [58].

Для решения проблем, связанных со снижением аффинности и специфичности, были разработаны методы созревания на фаговом или дрожжевом дисплее. В этих методах в последовательности, кодирующие антигенсвязывающие участки, вносятся одиночные замены, за счёт чего получается разнообразная выборка, из которой затем отбираются наиболее аффинные и специфичные структуры. В силу меньшей стоимости и трудоёмкости работы с фрагментами антител данный подход оказывается весьма эффективным [63].

Методы молекулярного моделирования в разработке и исследовании фрагментов антител. В силу меньших размеров фрагментов методы молекулярного моделирования, применяемые к разработке и оптимизации целых антител, оказываются более эффективными [64, 65].

Использование небольших участков антител позволяет разрабатывать биспецифические связывающие системы, состоящие из фрагментов двух разных антител, соединённых линкером. Методы молекулярного моделирования были успешно

применены для создания биспецифических одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), ингибирующих образование комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) с главным комплексом гистосовместимости (MHC-II) в присутствии стафилококкового энтеротоксина В (SEB). Важнейшим инструментом моделирования в данной работе оказалась молекулярная динамика, в которой на микросекундной траектории был показан механизм аллостерического ингибирования образования комплекса SEB–TCR [66].

В данной работе были использованы переменные домены известных антител для формирования биспецифической системы, однако для моделирования новых белок-связывающих фрагментов антител необходимы методы предсказания их структуры. Инструменты, используемые для моделирования полных антител, оказываются малоэффективными в данной задаче, так как подвижность фрагментов антител из-за отсутствия стабильных доменов изменяется [67]. Для подобных задач были разработаны специальные программы, такие как NanoNet. Данная модель глубокого обучения способна с высокой точностью и производительностью (примерно 1 млн структур за четыре часа на стандартном центральном процессорном устройстве) моделировать структуры нанотел, имея на входе информацию только об их аминокислотной последовательности. Подобные модели в сочетании с гибким белок-белковым докинггом могут выступать в качестве инструментов виртуального скрининга для поиска новых белок-связывающих аффинных и специфичных систем [68].

Таким образом, несмотря на меньшие размеры фрагментов антител в сравнении с полными моноклональными антителами, их моделирование сталкивается с теми же трудностями и требует значительного количества вычислений.

Антителомиметики. Структуры и методы разработки белковых антителомиметиков. Антитела и их фрагменты являются наиболее широко используемыми белковыми аффинными и специфичными белок-связывающими системами. Однако они имеют ряд свойств, ограничивающих их применение. Так, высокая стоимость производства и низкая стабильность, которая влечёт за собой проблемы с агрегацией, иммуногенностью, высокой стоимостью хранения и логистикой, оказываются основными лимитирующими факторами для расширения сфер применения антител. Во многом это связано с нативной структурой антител, не предназначенной изначально для существования вне живых систем. Несмотря на малые размеры фрагментов антител, их структура всё ещё не является оптимальной и включает достаточно большие участки, функция которых

ограничена только в поддержании структуры сайта связывания [69].

По этой причине возникла идея разработки белок-связывающих систем негомологичных антител, которые принято называть антителомиметиками (другое используемое название – Non-Immunoglobulin Epitope Binders). Конструирование более простых белковых структур, обладающих повышенной аффинностью и специфичностью, позволяет избавиться от ограничений антител, в то же время сохранив их полезные качества.

Антителомиметики белковой природы в своей структуре содержат простые жёсткие каркасы из альфа-спиралей или бета-слоёв, в то время как их белок-связывающие участки обычно являются свободными петлями [70]. Примеры белковых каркасов для антителомиметиков показаны на рис. 4. Для их разработки обычно используются методы сайт-направленного или случайного мутагенеза, а производятся они с использованием простых бактериальных реакторов, показывающих более высокий выход продукта в сравнении с антителами [63].

Наиболее общим способом разработки антителомиметиков является цикл направленной эволюции с последующим отбором кандидатов. Так, первичная библиотека ДНК, кодирующая гомологичные белковые структуры, подвергается ПЦР с высокой вероятностью ошибок чтения, что достигается путём введения солей марганца в реакционную систему. В результате значительно возрастает разнообразие аминокислотных последовательностей относительно исходной библиотеки. Далее, с использованием метода фагового дисплея производится отбор наиболее перспективных последовательностей, имеющих повышенную аффинность и специфичность, после чего процесс повторяется [71]. Таким образом, за ограниченное число циклов может быть получена высокоаффинная и специфичная белок-связывающая система с высокой стабильностью.

Однако у данного метода существуют ограничения, которые препятствуют масштабному выходу на рынок антителомиметиков. Так, при создании антителомиметиков белковой природы возникает сложность в поиске белкового каркаса. Несмотря на большое разнообразие уже известных каркасов, таких как аффитела (В-домен стафилококкового белка А), аднектины (внеклеточный домен человеческого фибронектина III), аффитины (варианты ДНК-связывающего белка Sac7d) и др., каждый белковый каркас имеет свои недостатки, а поиск новых ограничен возможностью расшифровки пространственной структуры белков. Поскольку большинство данных белков имеет чужеродную для организма структуру, они оказываются иммуногенными, что ограничивает

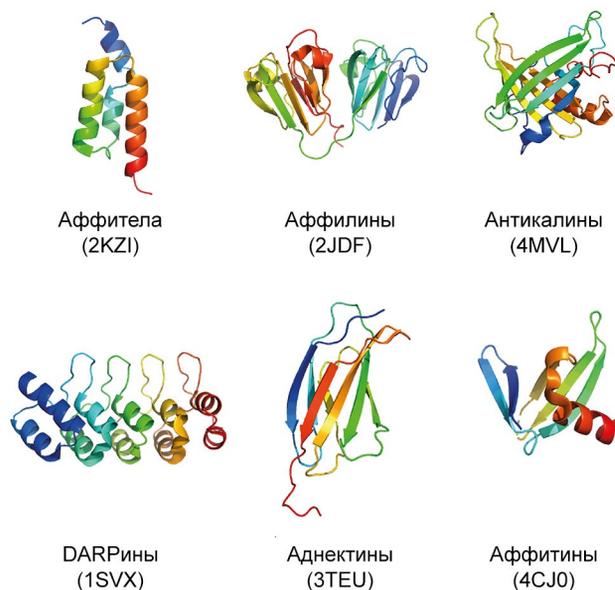


Рис. 4. Примеры белковых каркасов антителомиметиков белковой природы. В скобках приведены коды PDB

их применение *in vivo*. Также из-за отсутствия Fc-фрагментов они не имеют эффекторных функций [63]. Таким образом, хотя антителомиметики белковой природы лишены большинства недостатков антител, их количество и области применения на данный момент ограничены.

Методы молекулярного моделирования в исследовании и разработке белковых антителомиметиков. Использование методов молекулярного моделирования позволяет решать ряд наиболее важных проблем при разработке белковых антителомиметиков. Каркасная структура антителомиметиков обычно представляет собой стабильный водорастворимый фрагмент известных белков, которые могут принимать правильную конформацию в бактериальных клетках. Это упрощает их поиск, так как данные фрагменты преимущественно состоят из гидрофильных аминокислотных остатков с низким содержанием цистеинов и др. [72]. Можно статистически выделить ограниченный состав аминокислот, которые могут быть использованы для формирования структуры, обладающей заданными свойствами растворимости, pH-чувствительности и т.д. без ухудшения параметров связывания. В результате могут быть получены белки, структура которых является стабильной в широком диапазоне температур и кислотности. Для предсказания пространственной структуры таких белков могут использоваться программы AlphaFold2 и RosettaFold. Однако при этом остаётся неясной точность предсказания этими программами, поскольку они в большей степени обучены на гомологичных структурах [73]. Возможным решением этой

проблемы может быть применение диффузионных моделей глубокого обучения, таких как AlphaFold3 и Chroma, способных предсказывать структуру белков на основе желаемых параметров [74, 75]. Благодаря свойству диффузионных моделей производить маленькие шаги в процессе генерации, вводимые ограничения могут в конечном итоге направлять моделирование в сторону нужных свойств. Результаты предсказаний Chroma, проверенные в эксперименте, показали незначительное различие в структурах (RMSD около 1 Å). Так как Chroma обладает субквадратичной вычислительной сложностью от $O(N)$ до $O(N \log N)$, данный инструмент может оказаться очень полезным для разработки каркасных структур для антителомиметиков белковой природы [75]. Серьёзным ограничением диффузионных моделей являются так называемые «галлюцинации», то есть способность данных методов создавать нереалистичные структуры и связи, противоречащие физическим свойствам [76]. По этой причине требуется серьёзная экспертная оценка результатов моделирования.

Однако методы моделирования структуры не решают проблему потенциального иммунного ответа на полученные белковые структуры. На основе данных протеомики были созданы базы данных, такие как SEDB, Epitome, IEDB, AntiJen и VsiPer, в которых хранится информация об эпитопах, распознаваемых T-, B-клеточными рецепторами и антителами, а также встраивающихся в МНС [77–81]. Данная информация может помочь в установлении потенциальных эпитопов и их замене на этапе проектирования белковых каркасов, что может снизить их потенциальную иммуногенность.

Несмотря на меньший размер и низкую структурную сложность антителомиметиков по сравнению с антителами, в настоящее время существует мало примеров применения методов молекулярного моделирования для их разработки. Основным подходом при *de novo* дизайне белковых антителомиметиков является метод «горячих точек», сочетающий в себе докинг потенциально связывающихся пептидов и последующий подбор каркасов [82]. На основе данного метода были разработаны системы, аффинно связывающие консервативные участки гемагглютинина вируса гриппа (HA). В результате моделирования были сконструированы два высокоаффинных белка, после чего с помощью рентгеноструктурного анализа была проанализирована структура комплекса гемагглютинина с антителомиметиком, имеющим наилучшие показатели аффинности. В результате было показано, что предсказанная структура комплекса очень близка к экспериментально определённой [83].

Комбинация различных подходов, в том числе высокомолекулярного гибкого докинга, производительной молекулярной динамики, методов глубокого обучения в предсказании пространственных структур и методов вычисления иммуногенности способна в значительной степени усовершенствовать существующие и привести к разработке новых белковых антителомиметиков, имеющих ряд преимуществ и лишённых недостатков моноклональных антител и их производных.

НЕБЕЛКОВЫЕ АФФИННЫЕ БЕЛОК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СИСТЕМЫ

Аптамеры. Структура и применение аптамеров. Аффинные системы белковой природы имеют недостатки, связанные со стоимостью производства, сложностью хранения и логистики, иммуногенностью и др. Это стимулировало поиск белок-связывающих систем небелковой природы. Одними из наиболее перспективных из них оказались аптамеры.

Аптамеры – это короткие одноцепочечные молекулы ДНК, РНК или синтетических нуклеиновых кислот обычно длиной от 20 до 60 нуклеотидов, обладающие высокой аффинностью и специфичностью для взаимодействия с высоко- и низкомолекулярными мишенями [84]. Аптамеры были независимо открыты двумя группами в 1990 году как результат процесса, который получил название SELEX (систематическая эволюция лиганда путём экспоненциального обогащения) [84, 85]. Позднее аптамеры были найдены в природе в составе рибопереключателей бактерий [86].

Идея использовать нуклеиновые кислоты для распознавания белковых мишеней возникла в результате исследований вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Было показано, что трансактивационный регулирующий элемент (TAR), содержащий последовательности РНК, может ингибировать репликацию ВИЧ за счёт связывания с вирусным белком Tat с высокой аффинностью и специфичностью [87]. Несмотря на то что аптамеры совершенно не похожи на антитела, считается, что они могут конкурировать с антителами как в диагностическом, так и в терапевтическом применении [88]. Хотя аптамеры распознают и связывают мишени так же, как и антитела, они имеют ряд преимуществ, таких как более короткое время и низкая стоимость производства, более лёгкая модифицируемость, лучшая термическая и химическая стабильность, меньший размер и низкая иммуногенность [89].

Благодаря конкурентным преимуществам в отношении антител аптамеры нашли применение

в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии, а также диагностики и терапии. Одной из перспективных областей исследований, основанных на аптамерах, является область оптических сенсоров. Многочисленные исследования показали, что флуоресцентные красители, присоединённые к конформационно гибким областям аптамера, могут давать оптический сигнал в ответ на связывание с лигандом [90]. На рынке тем не менее аптамеры представлены в незначительном количестве в сравнении с антителами, что связано в первую очередь с отсутствием острой необходимости в перестройке инфраструктуры, которая является экономически затратным и на данный момент нецелесообразным процессом для большинства направлений [91].

Множество аптамеров, созданных для терапевтических целей, проходят клинические испытания или уже выведены на рынок. Среди них препараты для лечения возрастной макулодистрофии, нарушения свёртываемости крови, рака, воспалительных процессов и др. [89, 92].

Помимо использования в качестве лекарственных средств, аптамеры могут быть использованы для адресной доставки лекарств в клетки человека для повышения эффективности препарата и снижения побочных эффектов [93]. Человеческий простатический специфический мембранный антиген (PSMA), трансмембранный белок, ассоциированный с раком простаты, который сверхэкспрессируется на поверхности опухолей, стал первой модельной системой для доставки лекарств на основе аптамеров [94]. Биспецифические аптамеры против gp120 и рецептора CD4 доставляют действующее вещество на основе малой интерферирующей РНК, подавляя активность ВИЧ *in vitro* [95].

Способы разработки и получения аптамеров. Стандартный метод создания аптамеров, SELEX, является аналогом цикла направленной эволюции с последующим отбором кандидатов, способных связываться с белками, но вместо фагового дисплея и экспрессии внутри бактериальных клеток используется инкубация *in vitro* и ПЦР. В процессе SELEX интересующая мишень сначала инкубируется с набором из $\sim 10^9$ – 10^{11} одноцепочечных случайных олигонуклеотидов, называемым первичной библиотекой. Олигонуклеотиды в библиотеке SELEX обычно состоят из 40–100 нуклеотидов, что обусловлено ограничениями химического синтеза, имеют случайную область в середине и общие последовательности на обоих концах для посадки праймеров. После инкубации первичной библиотеки с мишенью несвязанные олигонуклеотиды удаляются, а комплекс аптамер–белок разделяется. Освободившиеся последовательности ДНК амплифицируют

методом ПЦР с повышенным мутагенезом за счёт введения солей марганца. В зависимости от задачи в ходе стандартного SELEX обычно проводится несколько циклов (повторов) процедуры [85]. Потенциальные аптамеры, полученные в результате нескольких раундов отбора, секвенируются, а параметры их связывания с мишенью оцениваются такими методами, как поверхностный плазмонный резонанс или изотермальная калориметрия. Для обогащения аптамеров с высоким сродством к мишени обычно проводится до двадцати раундов отбора [96].

Традиционный SELEX – это основной инструмент генерации аптамеров, однако он не лишён недостатков. Первичная библиотека должна содержать как можно большее разнообразие структур, в то же время в ней должны отсутствовать двухцепочечные нуклеиновые кислоты, а также одноцепочечные линейные структуры, не способные обеспечить надёжную пространственную укладку. Задача поиска оптимальной первичной библиотеки до сих пор не решена [97]. Обычно для повышения её разнообразия вводится большее количество структур с высокой долей GC-пар. Было показано, что повышение доли GC-пар первичной библиотеки приводит к большей сложности пространственных структур, вследствие чего наблюдается большее разнообразие потенциальных аптамеров, а также повышается их средняя аффинность [98].

Другим подходом для увеличения разнообразия первичной библиотеки является подход компании «Soma Logic» (дочерняя компания «Standard BioTools»). В первичной библиотеке компании, используемой для производства специальных модифицированных аптамеров, называемых SOMАмерами, содержится большое количество структур, в составе которых тимины заменены на C5'-этинил-2'-дезоксинуридины. В процессе SELEX к данным остаткам присоединяются боковые радикалы аминокислот или другие модификации, расширяющие свойства получаемых аптамеров [99]. Тем не менее явными ограничениями данного метода являются повышенная стоимость и возможность введения только одной химической модификации в структуру SOMАмера.

Процесс ПЦР, с помощью которого происходит обогащение при SELEX, является неидеальным. В силу большого разнообразия вторичных структур в первичной библиотеке и большей скорости синтеза коротких последовательностей происходит сдвиг, который может приводить к чрезмерному обогащению библиотеки структурами не с максимальным соответствием требуемым параметрам, а максимально выгодными для реакции полимеризации. Для решения данных проблем обычно применяется эмульсионная ПЦР,

в которой каждая отдельная структура копируется в микросомах, таким образом, не конкурируя за активный центр полимеразы [100].

Существует большое количество вариаций оптимизации процесса SELEX, однако в настоящее время его эффективность всё ещё остаётся на уровне 30% вероятности обнаружения требуемого аптамера [101].

Одним из важных ограничений аптамеров в сравнении с антителами является отсутствие гидрофобных свойств в структурах природных нуклеиновых кислот. Одним из решений являются упомянутые выше SOMАмеры, к которым, в частности, могут быть добавлены боковые радикалы гидрофобных аминокислот, например, бензильный радикал (рис. 5, а). Однако данная модификация является трудоёмкой и не универсальной, так как полученные аптамеры не копируются напрямую в ПЦР, и требуются дополнительные стадии. Более перспективной является возможность добавления синтетической пары оснований, такой как dNaM-d5SICS (рис. 5, а). За счёт полиароматической углеводородной группы данная пара оснований оказывается гидрофобной, в то же время сохраняется способность её комплементарного воспроизведения в ПЦР за счёт использования модифицированных ДНК-полимераз [102]. Тем не менее добавление новой пары оснований в первичную библиотеку для SELEX требует повышения разнообразия и значительно увеличивает стоимость процесса.

Другим ограничением аптамеров при их использовании в качестве терапевтических средств, в отличие от антител, является отсутствие у них эффекторной функции. Был предложен метод последовательного сшивания свободных концов двух аптамеров, один из которых связывается с целевым белком, а второй связывается с FcRγIII. Таким образом, был получен эффекторный аптамер, способный вызывать иммунный ответ в результате связывания с белком-мишенью [103].

Так как аптамеры являются короткими олигонуклеотидами, они подвержены деградации под действием различных факторов. Аптамеры на основе молекул РНК являются крайне нестабильными, так как подвержены аутодеградации за счёт образования промежуточных связей 2'-гидроксильной группы с фосфатом, а также из-за высокой степени контаминации окружающей среды рибонуклеазами, катализирующими расщепление РНК [104, 105]. С точки зрения стабильности ДНК-аптамеры оказываются более практичными, тем не менее они также могут деградировать под действием дезоксирибонуклеаз *in vivo*. Было разработано множество модификаций аптамеров, способных препятствовать и аутодеградации, и действию различных нуклеаз (рис. 5, б).

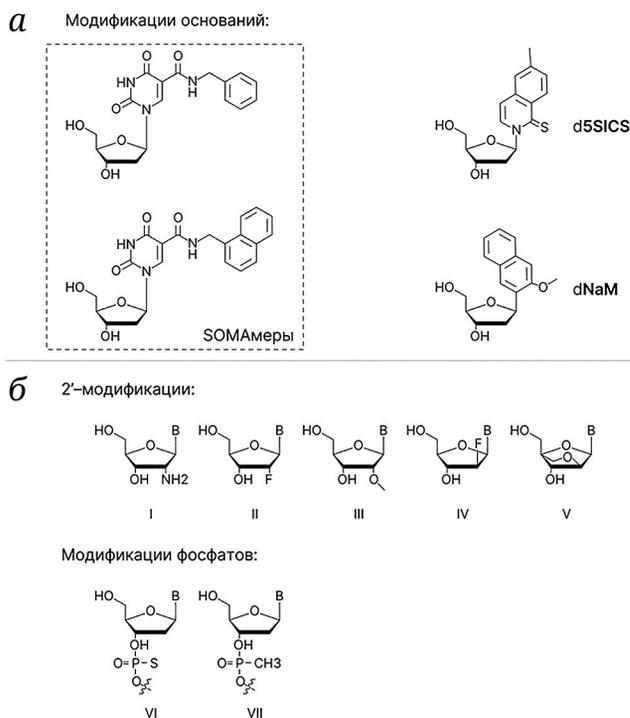


Рис. 5. Модификации нуклеиновых кислот для увеличения аффинности аптамеров и их устойчивости к действию нуклеаз. **а** – Модификации оснований для добавления свойства гидрофобности. **б** – Модификации для увеличения устойчивости к аутодеградации и действию нуклеаз. Буква В отражает любое из оснований. 2'-амино-(I), 2'-фтор-(II), 2'-О-метил-дезоксирибоза (III), 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-D-арабинонуклеиновая кислота (IV), закрытая нуклеиновая кислота (Locked Nucleic acid, LNA) (V) и модификации фосфатов (VI, VII)

Изменение 2'-группы на amino-(I), фтор-(II) или O-метильную группу (III) препятствует аутодеградации, а также не позволяет нуклеазам производить расщепление. Однако данная модификация значительно повышает подвижность нуклеиновых кислот, сопоставимую с подвижностью РНК, и, следовательно, может влиять на структуру получаемой молекулы. 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-D-арабинонуклеиновая кислота (IV) и закрытая нуклеиновая кислота (Locked Nucleic acid, LNA) (V) используются в аптамерах, так как значительно повышают устойчивость к нуклеазам, имея подвижность молекулы ДНК [106]. Более эффективным в данном случае оказывается замещение кислорода в остатке фосфорной кислоты на серу или метильную группу, которые не влияют на структуру дезоксирибозы. В этих случаях аптамер оказывается устойчивым к действию нуклеаз, однако изменение суммарного заряда молекулы повышает её склонность к неспецифическому связыванию с мишенью [106, 107]. Разработанные модификации, вносимые для увеличения устойчивости к действию нуклеаз или увеличения аффинности,

препятствуют протеканию полимеризации в процессе ПЦР, что усложняет процесс SELEX [108].

Методы молекулярного моделирования в разработке и исследовании аптамеров. Метод отбора аптамеров из библиотеки первичных последовательностей. Для оптимизации разработки аптамеров были предложены многочисленные методы, основанные на молекулярном моделировании. Основными вычислительными подходами стали докинг и молекулярная динамика, позволяющие симулировать взаимодействие аптамера и мишени. Иногда данные методы дополняют квантово-механическими или гибридными методами вычисления энергии для более точной оценки связывания [109]. Методы предсказания вторичной и третичной структуры РНК и ДНК играют важную роль в разработке молекул, поскольку для проведения моделирования комплексов белок-аптамер необходима их третичная структура [110]. Современные инструменты *in silico* дают возможность моделировать аптамеры как под малые молекулы, так и под сложные биополимеры. Единственное их ограничение, в отличие от метода SELEX – невозможность использовать клетки в качестве мишени. Типичный цикл моделирования аптамера в исследовании *in silico* начинается с прогнозирования вторичной структуры с последующим предсказанием и оптимизацией третичной структуры. Далее производится жёсткий или гибкий докинг мишени и аптамера, при этом отбираются комплексы с наибольшими оценками связывания. Следующим важным, но не обязательным шагом является этап молекулярной динамики, позволяющий оценить стабильность комплекса и определить энергию связи с более высокой точностью [111]. Анализ взаимодействия аптамера с мишенью позволяет исследователям проводить замены нуклеотидов или их химические модификации, после чего предыдущие шаги можно повторить с новыми кандидатами [112]. Помимо методов моделирования структур и их взаимодействия, модели взаимосвязи структура–активность (QSAR) начали применять в разработке аптамеров для быстрого предсказания требуемой характеристики и сканирования пространства последовательностей [113–115].

Все вышеперечисленные вычислительные методы могут быть использованы вместе с экспериментальными, дополняя друг друга и повышая эффективность. К примеру, для повышения разнообразия первичной библиотеки SELEX было предложено использовать методы предсказания вторичных структур, которые позволяют оценивать их сложность и отбирать последовательности с наибольшим потенциалом. Такие методы также могут быть применены для подбора пра-

вильного соотношения структур в первичной библиотеке для устранения неравномерного течения ПЦР [116]. Тем не менее методы предсказания вторичной структуры в основном низкопроизводительны и не способны предсказать большое количество различных структур за ограниченное время. В то же время они обычно применимы к РНК, в то время как аптамеры преимущественно делаются на основе ДНК в силу их большей структурной стабильности и экономической эффективности. Также большинство методов предсказания вторичных структур игнорируют распространённую структуру псевдоузла из-за высокой вычислительной стоимости её предсказания [116, 117]. Поэтому было предложено использовать методы глубокого обучения, благодаря чему были разработаны модели, способные с высокой скоростью и точностью предсказывать структуры нуклеиновых кислот [118]. Однако в настоящее время экспериментальных данных о структурах одноцепочечных ДНК ещё недостаточно для качественного обучения моделей.

Библиотека первичных последовательностей SELEX содержит большое число разнообразных последовательностей, однако финальный аптамер, выбранный для данной мишени, может быть всё ещё не оптимальным, то есть обладать низкой стабильностью пространственной структуры или аффинностью. При разработке аптамера, связывающего антибиотик сульфадиметоксин, был применён многостадийный подход по внесению точечных замен в аптамер с последующей молекулярной динамикой [119]. За основу авторами был взят аптамер, созданный с помощью SELEX. Его взаимодействие с мишенью было смоделировано с помощью молекулярной динамики, аффинность взаимодействия оценивалась как изменение свободной энергии Гиббса при взаимодействии между аптамером и целевой молекулой. В структуру аптамера вносились точечные замены, после чего снова производилась молекулярная динамика и оценка связывания. Авторы выбирали лучшие последовательности на каждом шаге, благодаря чему смогли увеличить аффинность аптамера, не прибегая к дополнительным экспериментам с помощью SELEX.

Другой пример подобного подхода – разработка аптамера против простатического специфического антигена (PSA) [120]. Авторы работы использовали пять последовательностей, полученных с помощью SELEX, в качестве стартовой точки для моделирования. Данные последовательности были размножены путём скрещивания последовательностей с использованием генетического алгоритма, после чего взаимодействие с мишенью оценивалось с использованием белок-белкового докинга. Лучшие кандидаты были синтезированы,

а их взаимодействие с мишенью измерено с помощью кварцевых микровесов, что позволило снова отобрать лучших кандидатов. Таким образом, последовательности итеративно оптимизировались под мишень, при этом использовались как реальные эксперименты, так и более простые и производительные компьютерные модели. В результате был получен аптамер, который показал в три раза более эффективное связывание по сравнению с исходными аптамерами, полученными по методу SELEX.

Метод направленного моделирования аптамеров на основе информации о структурах мишеней. В работах, описанных выше, использовали методы компьютерного моделирования преимущественно для усовершенствования существующих аптамеров, полученных экспериментально. Однако были предложены и подходы к *de novo* моделированию аптамеров на основе информации о структуре мишени. В исследовании по разработке аптамера для цитохрома P450 использовался метод «горячих точек» и подход по разделению нуклеотидной цепи на два типа участков. Первый участвует в образовании связей с белком за счёт свободных нуклеотидов, которые вносят основной вклад в аффинность и специфичность молекулы. Вторая же часть ответственна за поддержание пространственной структуры аптамера. После определения на поверхности белка участков, имеющих положительно заряженные аминокислоты, с помощью алгоритмов низкомолекулярного докинга и молекулярной динамики были получены структуры тринуклеотидов, связывающихся с поверхностью белка. К наиболее аффинным участкам были добавлены спиральные комплементарные участки для образования структуры шпильки. Синтезированные аптамеры показали высокую специфичность, не связываясь с белками других семейств, а экспериментально определённые энергии связывания имели высокую корреляцию с расчётными [121].

В процессе моделирования молекул, как правило, создаётся набор кандидатов, требующий оценки их эффективности для дальнейшего отбора. Проведение эксперимента для оценки связывания с мишенью будет самым точным, но в то же время самым затратным подходом. Поэтому часто используют методы молекулярного докинга и динамики. Однако длительные симуляции для большого числа кандидатов затратны по времени. Решением может быть использование методов машинного обучения для предсказания требуемой характеристики. Такой подход использовался для разработки аптамера против аминокептидазы CD13. Последовательности аптамеров генерировались итеративно с использованием генетического алгоритма. Отбор новых последо-

вательностей для следующего поколения производился оценочной функцией на основе модели машинного обучения, предварительно обученной на характеристиках первичной и вторичной структур РНК и белка [114]. В другой работе для разработки аптамеров против нейтрофильного желатиназа-ассоциированного липокалина использовали модель нейронной сети, обученной на экспериментальных данных, для изучения пространства последовательностей. Авторам удалось не только разработать и синтезировать аптамеры с высокой аффинностью, но и найти более короткие последовательности нуклеиновых кислот с сопоставимой аффинностью и большей стабильностью [115]. Однако подобные нейронные сети могут выявлять зависимости и совершенствовать уже известные структуры, но при поиске новых соединений исключать перспективные структуры из рассмотрения. По этой причине они нуждаются в тщательном тестировании и должны быть хорошо интерпретируемыми.

Наиболее перспективными методы молекулярного моделирования оказываются в разработке модифицированных аптамеров, более пригодных для применения в терапии. Так, с помощью *in silico* подходов к разработке аптамеров может быть выбрана оптимальная комбинация модификаций, способная увеличить аффинность, предотвратить деградацию под действием нуклеаз, но при этом не повлиять на специфичность. Был предложен подход, в котором последовательное применение различного программного обеспечения позволяло моделировать модифицированные аптамеры и их взаимодействие с белками-мишенями [122]. В этой работе использовали классический путь предсказания третичной структуры аптамеров, за которым следовало внесение модификаций, после чего производился высокомолекулярный докинг и выявлялись взаимодействующие основания. В работе использовали программы Mfold и 3dRNA для предсказания пространственных структур нуклеиновых кислот. Однако метод Mfold не способен предсказывать псевдоузлы, к тому же является низкопроизводительным [123]. Метод 3dRNA также является низкопроизводительным и показывает значительное расхождение между экспериментальными и предсказанными структурами (RMSD около 4 Å) [124]. Таким образом, из-за невысокой точности предсказания и низкой производительности данный метод ограничен в использовании для моделирования новых аптамеров для заданной мишени.

Другим очевидным ограничением метода стало отсутствие этапа молекулярной динамики, которая могла бы оптимизировать структуру комплекса. Внесение даже единичных модификаций может значительно влиять на пространственную

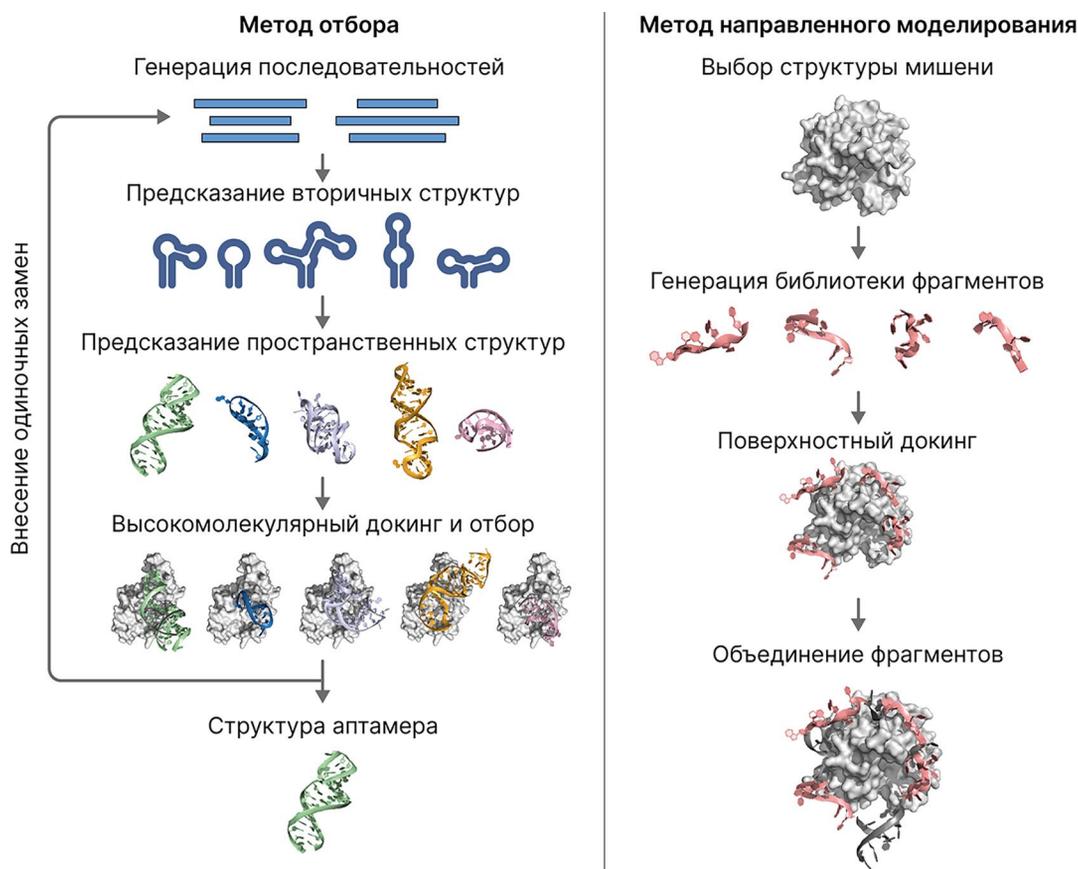


Рис. 6. Схема применения методов молекулярного моделирования в разработке и оптимизации аптамеров

структуру нуклеиновой кислоты [125]. По этой причине после внесения модификаций структуру необходимо подвергать длительной молекулярной динамике для исследования конформационных изменений. Однако стандартные силовые поля для моделирования нуклеиновых кислот не могут быть применены для симуляции модифицированных нуклеиновых кислот. В работе Galindo-Murillo et al. была проведена параметризация модифицированных нуклеотидов, которая позволила проводить молекулярную динамику нетипичных оснований и показала хорошее соответствие полученных результатов моделирования и эксперимента. Однако спектр параметризованных модификаций был ограниченным [126]. Существующие универсальные силовые поля способны производить симуляцию молекул с множеством различных модификаций, но для биополимеров данные силовые поля плохо согласуются с экспериментами [127].

Таким образом, существует два перспективных направления развития методов молекулярного моделирования аптамеров на основе структуры мишени. Одна группа методов имитирует процесс отбора, характерного для SELEX, с использованием предсказания пространственной структуры, докинга и молекулярной динамики, вторая

производит направленную разработку структуры нуклеиновой кислоты, способную связываться с эпитопом на поверхности белка. Общая схема применения данных подходов показана на рис. 6. Оба подхода требуют качественного предсказания вторичной и третичной структуры, а также использования методов молекулярной динамики. Развитие данных методов является наиболее важным для успешного прогнозирования новых аптамеров.

Молекулярные отпечатки. Структура и способы получения молекулярных отпечатков. Для получения ещё более простых в производстве аналогов антител в 1973 году был предложен метод полимерных молекулярных отпечатков (molecularly imprinted polymers, MIP) [128]. MIP представляют собой пористые материалы, способные селективно узнавать шаблон (молекулы, на узнавание которых разрабатывается MIP). Они получают путём самосборки функциональных мономеров вокруг молекулы шаблона в порогене (растворитель для образования пор), после чего инициируется полимеризация в присутствии сшивающего реагента [129]. MIP находят множество применений в таких областях, как диагностика (включая аналоги иммуноферментного анализа), аффинное разделение, доставка лекарств и др. [130–135].

Исходно MIP были созданы для низкомолекулярных соединений, но в настоящее время их начинают использовать и для белковых молекул.

Основной подход к получению молекулярных отпечатков заключается в направленном создании поверхности с геометрическим и физико-химическим соответствием шаблону. На первом этапе добавляют функциональные мономеры, которые взаимодействуют с шаблоном и образуют прочный комплекс. На втором этапе проводят полимеризацию полученного комплекса в присутствии избыточного количества сшивающих мономеров и порогена. На последнем этапе происходит вымывание шаблона из молекулярного отпечатка, за счёт чего образуется полость для специфического связывания белка-мишени [136, 137].

Существует два основных подхода к получению молекулярных отпечатков. Первый включает использование ковалентных функциональных мономеров, которые создают химическую связь с молекулой шаблона, а после этапа полимеризации ковалентные связи расщепляются. В силу сложности данной процедуры и необходимости дополнительных этапов расщепления данный подход практически не используется в отношении белков.

Второй подход основан на образовании относительно слабых нековалентных взаимодействий между шаблоном и функциональными мономерами, таких как водородные связи, ионные взаимодействия, силы Ван-дер-Ваальса, диполь-дипольные и гидрофобные взаимодействия. В силу простоты данный подход в настоящее время является наиболее распространённым. Однако подход с нековалентным связыванием требует более тщательного подбора состава и количества функциональных мономеров [138].

Процедура получения MIP всегда связана с тщательным подбором состава смеси и условий реакции в зависимости от структуры шаблона и выбранного полимера, что является одним из основных недостатков этого метода. Кроме необходимости случайного перебора возможных компонентов, функциональных и сшивающих мономеров, порогенов и условий протекания реакции, данный процесс также является слабо воспроизводимым. Кроме того, для получения каждой новой партии молекулярного отпечатка требуется использование шаблона, что отрицательно сказывается на масштабируемости производства [139].

Для решения проблемы перебора компонентов был предложен метод комбинаторной химии, в котором создаётся большое разнообразие возможных составов, и эксперименты по получению молекулярных отпечатков происходят параллельно [140, 141].

Дополнительные сложности при создании MIP для белков создают условия полимеризации: повышенная температура, неестественная для белков величина pH, органические растворители, что может привести к изменению структуры шаблона [132]. В качестве альтернативы использования целого белка был предложен метод эпигенетического импринтинга. У большинства белков на поверхности есть участки с большим количеством полярных и заряженных аминокислот, которые наиболее часто участвуют в связывании. Вместо попытки полимеризации вокруг целого белка, что связано с большими трудностями в подборе условий, в которых полимеризация не будет нарушать структуру белка, могут быть использованы только фрагменты, включающие данный эпитоп. В силу меньшего размера и часто более стабильной структуры таких эпитопов данный подход повышает диапазон допустимых условий для протекания реакции полимеризации. Тем не менее для достижения полного соответствия данного эпитопа нативной структуре требуется проводить сложные работы, связанные с искусственным созданием меньших по размеру белков, сохраняющих структуру эпитопа [142].

Несмотря на возможность перебора большого количества компонентов смеси для получения структуры молекулярного отпечатка, сила взаимодействия функциональных мономеров с шаблоном обычно низкая, из-за чего мономеры добавляются в избытке. В результате часто возникает широкий спектр равновесных состояний комплекса мономеры-шаблон, что даёт широкий диапазон аффинности и специфичности у MIP [143].

Полимеризация вокруг матрицы должна происходить с возможностью последующего беспрепятственного удаления белка из сайта связывания и доступа для нового белка. Поэтому плотно полимеризующиеся сшивающие мономеры, используемые для разработки молекулярных отпечатков для малых молекул, для белков не подходят. Были предложены методы, позволяющие использовать изменение условий для регулирования размера пор, что позволяет контролировать процесс связывания и высвобождения белков. Для этого, в частности, было предложено проводить полимеризацию с добавлением pH-чувствительных сшивающих элементов пептидной природы, из-за чего при повышении pH поры и сайт связывания увеличиваются в размерах, и появляется возможность выхода белка [144].

Однако более популярным подходом стал метод поверхностных отпечатков, в котором шаблон покрывают тонким слоем полимера, не способным полностью погрузить белок в толщу и не препятствующим высвобождению и связыванию.



Рис. 7. Варианты белок-связывающих полимерных молекулярных отпечатков

Развитием данного метода является предполимеризация наночастиц, при которой функциональные мономеры связываются с заранее подготовленными наночастицами из сшивающего полимера, а после взаимодействия с белком-мишенью происходит полноценная полимеризация. Тем не менее независимо от метода данные подходы обычно значительно снижают специфичность связывания в сравнении с полимеризацией в объёме [145].

Сравнение вариантов белок-связывающих полимерных молекулярных отпечатков показано на рис. 7.

Методы молекулярного моделирования в разработке и исследовании молекулярных отпечатков. Разработка МІР – это длительный и дорогостоящий процесс. Он требует выбора оптимальных мономеров, подбора соотношения компонентов в реакционной смеси, оптимальных условий проведения реакции. Это затрудняет задачу и увеличивает время по разработке МІР, что ограничивает возможности для их широкого применения. Компьютерное моделирование может значительно оптимизировать этот процесс.

К настоящему времени основные работы по молекулярному моделированию МІР были проведены для низкомолекулярных соединений [146–149]. Основные усилия при этом были направлены на предполимеризационную стадию. Для этого использовались как методы квантовой механики, так и молекулярной динамики. Целью применения данных методов является поиск наиболее подходящего функционального мономера, оценка характера связывания и подбор оптимального соотношения компонентов реакционной смеси [150–157].

Для разработки МІР, связывающихся с белками, было предложено несколько вычислительных подходов [158–160]. Основными методами при этом являются молекулярный докинг и молекулярная динамика.

Одной из сложностей при создании МІР является его возможное влияние на структуру белка-шаблона. Так, было показано, что в процессе приготовления МІР происходит ингибирование рибонуклеазы А. Моделирование (с помощью метода молекулярной динамики) формирования комплекса белка с функциональными мономерами на основе стирена и сшивающего полимера, диметилакрилата полиэтиленгликоля 400, показало возможные конформационные изменения в белке, которые приводили к его инактивации [161]. В то же время исследование методом молекулярной динамики не выявило возможного влияния функциональных мономеров на структуру белка PSA [162].

В работе Kryscio et al. были изучены механизмы влияния условий процесса получения молекулярных отпечатков на конформацию альбумина. Для этого был применён докинг различных функциональных и сшивающих мономеров на поверхность белка. Были определены сайты преимущественного положения мономеров. В каждом из полученных участков наблюдалось серьёзное влияние на пространственную структуру. В то же время было показано, что различные функциональные мономеры конкурируют за одни и те же боковые радикалы аминокислотных остатков [158].

Методы молекулярного моделирования активно используются для подбора мономеров и поиска оптимальных соотношений реагентов в разработке МІР для белков [158, 163, 164]. В работе Rajpal et al. докинг применялся для анализа состава смеси функциональных мономеров, позволив подобрать оптимальный состав смеси для нескольких пептидов до проведения лабораторных экспериментов [165]. Докинг с последующей молекулярной динамикой были использованы для подбора концентраций функциональных и сшивающих мономеров для оптимального связывания миоглобина [159].

Помимо прогнозирования состава функциональных и сшивающих мономеров, важность представляет и прогнозирование аффинности молекулярных отпечатков к их мишени [166]. Была оценена применимость методов, основанных на глубоком обучении, в оценке аффинности молекулярных отпечатков к малым молекулам. Было показано, что использование различных моделей глубокого обучения позволяет хорошо предсказывать параметры связывания молекулярных отпечатков с 2-метоксифенидином. Подобный подход может быть применён и к анализу связывания с белком, что может в значительной степени упростить подбор компонентов и условий полимеризации при получении молекулярных отпечатков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Область применения аффинных и специфических систем явно развивается в сторону более простых, дешёвых и технологических решений. Первоначально это были моноклональные антитела, в том числе их производные: химерные, гуманизированные и человеческие моноклональные антитела. Желание упростить и удешевить производство и разработку антител привело к использованию их фрагментов, таких как одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), отдельный антиген-связывающий фрагмент (Fab'), минитела, нанотела и др. Развитием систем белковой природы стало получение антителомиметиков. Из-за сложности в хранении и применении белковых систем следующим этапом разработки стало получение систем небелковой природы, основными из которых являются аптамеры и полимерные молекулярные отпечатки. Каждая из разрабатываемых аффинных систем имеет как свои преимущества, так и недостатки. Можно ожидать, что и в дальнейшем эти технологии будут развиваться параллельно друг другу, и у разработчиков будет иметься широкий набор решений для выбора наиболее подходящей системы в каждом конкретном случае в зависимости от поставленных задач.

В последние годы на этапах разработки аффинных систем начали активно использовать методы молекулярного моделирования. Их применение во многом позволяет отказаться от традиционного подхода «проб и ошибок». Моделирование взаимодействия аффинной системы со своей мишенью позволяет более детально понять молекулярные механизмы, лежащие в основе высокоаффинного и специфического связывания, и на этой основе подобрать оптимальную структуру системы, а также условия её получения. Молекулярное моделирование становится неотъемлемой частью таких разработок.

Основными методами выступают:

1. Моделирование по гомологии для построения структур антител и их фрагментов, известных антителомиметиков, а также структуры мишени;
2. *Ab initio* методы для прогнозирования переменных связывающих частей антител, их фрагментов и антителомиметиков;
3. Низкомолекулярный докинг для подбора позы взаимодействующих оснований в задаче проектирования белковых связывающих систем и аптамеров (например, метод «горячих точек»), а также в подборе состава для разработки молекулярных отпечатков;
4. Высокомолекулярный докинг для предсказания структур комплексов белок-белок или белок-нуклеиновая кислота;
5. Методы молекулярной механики, квантовой химии и статистики для оценки энергии взаимодействия, что является основой отбора более аффинных связывающих систем;
6. Молекулярная динамика, позволяющая моделировать поведение молекулярных систем в естественных условиях, оценивать стабильность моделируемых структур и их комплексов.

Классические методы моделирования продолжают совершенствоваться, но в последние годы наблюдается резкое увеличение интереса к системам предсказания, основанным на глубоком обучении. Способность нейронных сетей улавливать скрытые закономерности позволяет создавать программы, обладающие высокой предсказательной силой. Системы на основе глубокого обучения используются при моделировании или *de novo* проектировании структур белков и белок-белковых комплексов (в том числе антител и комплексов антиген-антитело), нуклеиновых кислот, позволяют аппроксимировать физико-химические характеристики, ускорять вычислительно дорогие процессы симуляций и другое. Тем не менее серьёзным недостатком методов, основанных на глубоком обучении, является ограниченность обучающих данных. В связи с этим часто возникают проблемы снижения точности или «галлюцинации», которые мешают данным методам полностью вытеснить классические.

Современные пакеты программного обеспечения, в том числе свободно распространяемые и веб-сервисы, позволяют проводить весь цикл вычислений при разработке всех типов аффинных систем, однако требуется наработка большего количества данных, совершенствование алгоритмов и сравнительные исследования применимости разных методов для увеличения их точности, производительности и результативности.

Вклад авторов. Насаев Ш.Ш., Муканов А.Р., Мишкорез И.В., Долгушева В.А. – концепция, написание текста, иллюстрирование; Кузнецов И.И., Лейбин И.В., Павлюк Г.А., Манасян А.Л. – написание текста, редактирование статьи; Веселовский А.В. – руководство работой, редактирование статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных иссле-

дований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг., № 122030100170-).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berson, S. A., and Yalow, R. S. (1968) General principles of radioimmunoassay, *Clin. Chim. Acta*, **22**, 51-69, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(68\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(68)90247-7).
2. Rhiel, L., and Becker, S. (2021) *Applications of Antibodies in Therapy, Diagnosis, and Science*, Springer International Publishing, Cham.
3. Vengesai, A., Midzi, H., Kasambala, M., Mutandadzi, H., Mduluzza-Jokonya, T. L., Rusakaniko, S., Mutapi, F., Naicker, T., and Mduluzza, T. (2021) A systematic and meta-analysis review on the diagnostic accuracy of antibodies in the serological diagnosis of COVID-19, *Syst. Rev.*, **10**, 155, <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01689-3>.
4. Stern, M., and Herrmann, R. (2005) Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **54**, 11-29, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.10.011>.
5. Bekes, M., Langley, D. R., and Crews, C. M. (2022) PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **21**, 181-200, <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>.
6. Rees, A. R. (2020) Understanding the human antibody repertoire, *MAbs*, **12**, 1729683, <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1729683>.
7. Liu, J. K. (2014) The history of monoclonal antibody development – progress, remaining challenges and future innovations, *Ann. Med. Surg. (Lond)*, **3**, 113-116, <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2014.09.001>.
8. Yang, O., Prabhu, S., and Ierapetritou, M. (2019) Comparison between batch and continuous monoclonal antibody production and economic analysis, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **58**, 5851-5863, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b04717>.
9. Alfaleh, M. A., Alsaab, H. O., Mahmoud, A. B., Alkayyal, A. A., Jones, M. L., Mahler, S. M., and Hashem, A. M. (2020) Phage display derived monoclonal antibodies: from bench to bedside, *Front. Immunol.*, **11**, 1986, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01986>.
10. Bradbury, A., and Pluckthun, A. (2015) Reproducibility: standardize antibodies used in research, *Nature*, **518**, 27-29, <https://doi.org/10.1038/518027a>.
11. Chothia, C., and Lesk, A. M. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, *J. Mol. Biol.*, **196**, 901-917, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90412-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90412-8).
12. Sircar, A., Sanni, K. A., Shi, J., and Gray, J. J. (2011) Analysis and modeling of the variable region of camelid single-domain antibodies, *J. Immunol.*, **186**, 6357-6367, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100116>.
13. Almagro, J. C., Teplyakov, A., Luo, J., Sweet, R. W., Kodangattil, S., Hernandez-Guzman, F., and Gilliland, G. L. (2014) Second antibody modeling assessment (AMA-II), *Proteins*, **82**, 1553-1562, <https://doi.org/10.1002/prot.24567>.
14. Zhu, K., and Day, T. (2013) *Ab initio* structure prediction of the antibody hypervariable H3 loop, *Proteins*, **81**, 1081-1089, <https://doi.org/10.1002/prot.24240>.
15. Leem, J., Dunbar, J., Georges, G., Shi, J., and Deane, C. M. (2016) ABodyBuilder: Automated antibody structure prediction with data-driven accuracy estimation, *MAbs*, **8**, 1259-1268, <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1205773>.
16. Schoeder, C. T., Schmitz, S., Adolf-Bryfogle, J., Sevy, A. M., Finn, J. A., Sauer, M. F., Bozhanova, N. G., Mueller, B. K., Sangha, A. K., Bonet, J., Sheehan, J. H., Kuenze, G., Marlow, B., Smith, S. T., Woods, H., Bender, B. J., Martina, C. E., del Alamo, D., Kodali, P., Gulsevin, A., et al. (2021) Modeling immunity with Rosetta: methods for antibody and antigen design, *Biochemistry*, **60**, 825-846, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00912>.
17. Marcatili, P., Rosi, A., and Tramontano, A. (2008) PIGS: automatic prediction of antibody structures, *Bioinformatics*, **24**, 1953-1954, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn341>.
18. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat. Protoc.*, **5**, 725-738, <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>.
19. Zhu, K., Day, T., Warshaviak, D., Murrett, C., Friesner, R., and Pearlman, D. (2014) Antibody structure determination using a combination of homology modeling, energy-based refinement, and loop prediction, *Proteins*, **82**, 1646-1655, <https://doi.org/10.1002/prot.24551>.

20. Whitelegg, N. R., and Rees, A. R. (2000) WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB, *Protein Eng.*, **13**, 819-824, <https://doi.org/10.1093/protein/13.12.819>.
21. Dunbar, J., Krawczyk, K., Leem, J., Marks, C., Nowak, J., Regep, C., Georges, G., Kelm, S., Popovic, B., and Deane, C. M. (2016) SAbPred: a structure-based antibody prediction server, *Nucleic Acids Res.*, **44**, W474-W478, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw361>.
22. Sircar, A., Kim, E. T., and Gray, J. J. (2009) RosettaAntibody: antibody variable region homology modeling server, *Nucleic Acids Res.*, **37**, W474-479, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp387>.
23. Weitzner, B. D., Kuroda, D., Marze, N., Xu, J., and Gray, J. J. (2014) Blind prediction performance of Rosetta-Antibody 3.0: grafting, relaxation, kinematic loop modeling, and full CDR optimization, *Proteins*, **82**, 1611-1623, <https://doi.org/10.1002/prot.24534>.
24. Su, Z. Y. (2014) Ibalizumab-human CD4 receptor interaction: computational alanine scanning molecular dynamics studies, *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, **10**, 217-225, <https://doi.org/10.2174/157340991003150302230124>.
25. Kiyoshi, M., Caaveiro, J. M., Miura, E., Nagatoishi, S., Nakakido, M., Soga, S., Shirai, H., Kawabata, S., and Tsumoto, K. (2014) Affinity improvement of a therapeutic antibody by structure-based computational design: generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody-antigen complex, *PLoS One*, **9**, e87099, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087099>.
26. Ferdous, S., and Martin, A. C. R. (2018) AbDb: antibody structure database-a database of PDB-derived antibody structures, *Database (Oxford)*, **2018**, <https://doi.org/10.1093/database/bay040>.
27. Kumar, N., Bajiya, N., Patiyal, S., and Raghava, G. P. S. (2023) Multi-perspectives and challenges in identifying B-cell epitopes, *Protein Sci.*, **32**, e4785, <https://doi.org/10.1002/pro.4785>.
28. Zeng, X., Bai, G., Sun, C., and Ma, B. (2023) Recent Progress in Antibody Epitope Prediction, *Antibodies*, **12**, 52, <https://doi.org/10.3390/antib12030052>.
29. Dai, B., and Bailey-Kellogg, C. (2021) Protein interaction interface region prediction by geometric deep learning, *Bioinformatics*, **37**, 2580-2588, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab154>.
30. Da Silva, B. M., Myung, Y., Ascher, D. B., and Pires, D. E. V. (2022) epitope3D: a machine learning method for conformational B-cell epitope prediction, *Brief. Bioinform.*, **23**, <https://doi.org/10.1093/bib/bbab423>.
31. Cia, G., Pucci, F., and Rooman, M. (2023) Critical review of conformational B-cell epitope prediction methods, *Brief. Bioinform.*, **24**, <https://doi.org/10.1093/bib/bbac567>.
32. Chu, L. S., Ruffolo, J. A., Harmalkar, A., and Gray, J. J. (2024) Flexible protein-protein docking with a multitrack iterative transformer, *Protein Sci.*, **33**, e4862, <https://doi.org/10.1002/pro.4862>.
33. Gray, J. J., Moughon, S., Wang, C., Schueler-Furman, O., Kuhlman, B., Rohl, C. A., and Baker, D. (2003) Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations, *J. Mol. Biol.*, **331**, 281-299, [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00670-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00670-3).
34. Sircar, A., and Gray, J. J. (2010) SnugDock: paratope structural optimization during antibody-antigen docking compensates for errors in antibody homology models, *PLoS Comput. Biol.*, **6**, e1000644, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000644>.
35. Zhao, J., Nussinov, R., and Ma, B. (2017) Mechanisms of recognition of amyloid-beta (Abeta) monomer, oligomer, and fibril by homologous antibodies, *J. Biol. Chem.*, **292**, 18325-18343, <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.801514>.
36. Guest, J. D., Vreven, T., Zhou, J., Moal, I., Jeliaskov, J. R., Gray, J. J., Weng, Z., and Pierce, B. G. (2021) An expanded benchmark for antibody-antigen docking and affinity prediction reveals insights into antibody recognition determinants, *Structure*, **29**, 606-621.e605, <https://doi.org/10.1016/j.str.2021.01.005>.
37. Mashlach, E., Nussinov, R., and Wolfson, H. J. (2010) FiberDock: a web server for flexible induced-fit backbone refinement in molecular docking, *Nucleic Acids Res.*, **38**, W457-461, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq373>.
38. Pierce, B., and Weng, Z. (2007) ZRANK: reranking protein docking predictions with an optimized energy function, *Proteins*, **67**, 1078-1086, <https://doi.org/10.1002/prot.21373>.
39. Cheng, T. M., Blundell, T. L., and Fernandez-Recio, J. (2007) pyDock: electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein-protein docking, *Proteins*, **68**, 503-515, <https://doi.org/10.1002/prot.21419>.
40. Lorenzen, S., and Zhang, Y. (2007) Identification of near-native structures by clustering protein docking conformations, *Proteins*, **68**, 187-194, <https://doi.org/10.1002/prot.21442>.
41. Ritchie, D. W., and Venkatraman, V. (2010) Ultra-fast FFT protein docking on graphics processors, *Bioinformatics*, **26**, 2398-2405, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq444>.
42. Zhu, F., Bourguet, F. A., Bennett, W. F. D., Lau, E. Y., Arrildt, K. T., Segelke, B. W., Zemla, A. T., Desautels, T. A., and Faissol, D. M. (2022) Large-scale application of free energy perturbation calculations for antibody design, *Sci. Rep.*, **12**, 12489, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14443-z>.
43. Zhou, Y., Myung, Y., Rodrigues, C. H. M., and Ascher, D. B. (2024) DDMut-PPI: predicting effects of mutations on protein-protein interactions using graph-based deep learning, *Nucleic Acids Res.*, **52**, W207-W214, <https://doi.org/10.1093/nar/gkae412>.

44. Wang, M., Zhu, D., Zhu, J., Nussinov, R., and Ma, B. (2018) Local and global anatomy of antibody-protein antigen recognition, *J. Mol. Recognit.*, **31**, e2693, <https://doi.org/10.1002/jmr.2693>.
45. Xue, L. C., Rodrigues, J. P., Kastritis, P. L., Bonvin, A. M., and Vangone, A. (2016) PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes, *Bioinformatics*, **32**, 3676-3678, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514>.
46. Chowdhury, R., Allan, M. F., and Maranas, C. D. (2018) OptMAVEN-2.0: *de novo* design of variable antibody regions against targeted antigen epitopes, *Antibodies (Basel)*, **7**, 23, <https://doi.org/10.3390/antib7030023>.
47. Poosarla, V. G., Li, T., Goh, B. C., Schulten, K., Wood, T. K., and Maranas, C. D. (2017) Computational *de novo* design of antibodies binding to a peptide with high affinity, *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 1331-1342, <https://doi.org/10.1002/bit.26244>.
48. Hummer, A. M., Abanades, B., and Deane, C. M. (2022) Advances in computational structure-based antibody design, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **74**, 102379, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102379>.
49. Yin, R., and Pierce, B. G. (2023) Evaluation of AlphaFold antibody-antigen modeling with implications for improving predictive accuracy, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.07.05.547832>.
50. Olsen, T. H., Moal, I. H., and Deane, C. M. (2022) AbLang: an antibody language model for completing antibody sequences, *Bioinform. Adv.*, **2**, vbac046, <https://doi.org/10.1093/bioadv/vbac046>.
51. Shuai, R. W., Ruffolo, J. A., and Gray, J. J. (2023) IgLM: Infilling language modeling for antibody sequence design, *Cell Syst.*, **14**, 979-989 e974, <https://doi.org/10.1016/j.cels.2023.10.001>.
52. Akbar, R., Robert, P. A., Pavlovic, M., Jeliakov, J. R., Snapkov, I., Slabodkin, A., Weber, C. R., Scheffer, L., Miho, E., Haff, I. H., Haug, D. T. T., Lund-Johansen, F., Safonova, Y., Sandve, G. K., and Greiff, V. (2021) A compact vocabulary of paratope-epitope interactions enables predictability of antibody-antigen binding, *Cell Rep.*, **34**, 108856, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108856>.
53. Bertoline, L. M. F., Lima, A. N., Krieger, J. E., and Teixeira, S. K. (2023/02/28) Before and after AlphaFold2: an overview of protein structure prediction, *Front. Bioinform.*, **3**, <https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1120370>.
54. Lai, P. K., Gallegos, A., Mody, N., Sathish, H. A., and Trout, B. L. (2022) Machine learning prediction of antibody aggregation and viscosity for high concentration formulation development of protein therapeutics, *MAbs*, **14**, 2026208, <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2026208>.
55. Marks, C., Hummer, A. M., Chin, M., and Deane, C. M. (2021) Humanization of antibodies using a machine learning approach on large-scale repertoire data, *Bioinformatics*, **37**, 4041-4047, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab434>.
56. Grinshpun, B., Thorsteinson, N., Pereira, J. N., Rippmann, F., Nannemann, D., Sood, V. D., and Fomekong Nanfack, Y. (2021) Identifying biophysical assays and *in silico* properties that enrich for slow clearance in clinical-stage therapeutic antibodies, *MAbs*, **13**, 1932230, <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1932230>.
57. Reis, P., Barletta, G. P., Gagliardi, L., Fortuna, S., Soler, M. A., and Rocchia, W. (2022) Antibody-antigen binding interface analysis in the big data era, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 945808, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.945808>.
58. Crivianu-Gaita, V., and Thompson, M. (2016) Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements, *Biosens. Bioelectron.*, **85**, 32-45, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.091>.
59. De Marco, A. (2020) Recombinant expression of nanobodies and nanobody-derived immunoreagents, *Protein Expr. Purif.*, **172**, 105645, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105645>.
60. Zelenovic, N., Filipovic, L., and Popovic, M. (2023) Recent developments in bioprocessing of recombinant antibody fragments, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1191-1204, <https://doi.org/10.1134/S0006297923090018>.
61. Fink, M., Schimek, C., Cserjan-Puschmann, M., Reinisch, D., Brocard, C., Hahn, R., and Striedner, G. (2021) Integrated process development: the key to improve Fab production in *E. coli*, *Biotechnol. J.*, **16**, e2000562, <https://doi.org/10.1002/biot.202000562>.
62. Mei, Y., Chen, Y., Sivaccumar, J. P., An, Z., Xia, N., and Luo, W. (2022) Research progress and applications of nanobody in human infectious diseases, *Front. Pharmacol.*, **13**, 963978, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.963978>.
63. Yu, X., Yang, Y. P., Dikici, E., Deo, S. K., and Daunert, S. (2017) Beyond antibodies as binding partners: the role of antibody mimetics in bioanalysis, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif.)*, **10**, 293-320, <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061516-045205>.
64. Tang, J., Zhang, C., Castillo, N. C., Lalaurie, C. J., Gao, X., Dalby, P. A., and Kozielski, F. (2023) Crystal structures and molecular dynamics simulations of a humanised antibody fragment at acidic to basic pH, *Sci. Rep.*, **13**, 16281, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42698-7>.
65. Paloni, M., and Cavallotti, C. (2017) Molecular modeling of the interaction of protein L with antibodies, *ACS Omega*, **2**, 6464-6472, <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01123>.

66. Bai, G., Ge, Y., Su, Y., Chen, S., Zeng, X., Lu, H., and Ma, B. (2021) Computational construction of a single-chain bi-paratopic antibody allosterically inhibiting TCR-staphylococcal enterotoxin b binding, *Front. Immunol.*, **12**, 732938, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732938>.
67. Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., and Whitlow, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins, *Science*, **242**, 423-426, <https://doi.org/10.1126/science.3140379>.
68. Cohen, T., Halfon, M., and Schneidman-Duhovny, D. (2022) NanoNet: rapid and accurate end-to-end nanobody modeling by deep learning, *Front. Immunol.*, **13**, 958584, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.958584>.
69. Harmsen, M. M., and De Haard, H. J. (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 13-22, <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1142-2>.
70. David, T. I., Pestov, N. B., Korneenko, T. V., and Barlev, N. A. (2023) Non-immunoglobulin synthetic binding proteins for oncology, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1232-1247, <https://doi.org/10.1134/S0006297923090043>.
71. Skerra, A. (2000) Engineered protein scaffolds for molecular recognition, *J. Mol. Recognit.*, **13**, 167-187, [https://doi.org/10.1002/1099-1352\(200007/08\)13:4<167::AID-JMR502>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1099-1352(200007/08)13:4<167::AID-JMR502>3.0.CO;2-9).
72. Moody, P., Chudasama, V., Nathani, R. I., Maruani, A., Martin, S., Smith, M. E., and Caddick, S. (2014) A rapid, site-selective and efficient route to the dual modification of DARpins, *Chem. Commun. (Camb.)*, **50**, 4898-4900, <https://doi.org/10.1039/c4cc00053f>.
73. Liu, S., Wu, K., and Chen, C. (2022) Obtaining protein foldability information from computational models of AlphaFold2 and RoseTTAFold, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **20**, 4481-4489, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.08.034>.
74. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., Beattie, C., et al. (2024) Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3, *Nature*, **630**, 493-500, <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
75. Ingraham, J. B., Baranov, M., Costello, Z., Barber, K. W., Wang, W., Ismail, A., Frappier, V., Lord, D. M., Ng-Thow-Hing, C., Van Vlack, E. R., Tie, S., Xue, V., Cowles, S. C., Leung, A., Rodrigues, J. V., Morales-Perez, C. L., Ayoub, A. M., Green, R., Puentes, K., Oplinger, F., et al. (2023) Illuminating protein space with a programmable generative model, *Nature*, **623**, 1070-1078, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06728-8>.
76. Anishchenko, I., Pellock, S. J., Chidyausiku, T. M., Ramelot, T. A., Ovchinnikov, S., Hao, J., Bafna, K., Norn, C., Kang, A., Bera, A. K., DiMaio, F., Carter, L., Chow, C. M., Montelione, G. T., Baker, D., Anishchenko, I., Pellock, S. J., Chidyausiku, T. M., Ramelot, T. A., Ovchinnikov, S., et al. (2021) *De novo* protein design by deep network hallucination, *Nature*, **600**, 7889, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04184-w>.
77. Ponomarenko, J., Papangelopoulos, N., Zajonc, D. M., Peters, B., Sette, A., and Bourne, P. E. (2011) IEDB-3D: structural data within the immune epitope database, *Nucleic Acids Res.*, **39**, D1164-1170, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq888>.
78. Schlessinger, A., Ofran, Y., Yachdav, G., and Rost, B. (2006) Epitome: database of structure-inferred antigenic epitopes, *Nucleic Acids Res.*, **34**, D777-780, <https://doi.org/10.1093/nar/gkj053>.
79. Saha, S., Bhasin, M., and Raghava, G. P. (2005) Bcipep: a database of B-cell epitopes, *BMC Genomics*, **6**, 79, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-79>.
80. Toseland, C. P., Clayton, D. J., McSparron, H., Hemsley, S. L., Blythe, M. J., Paine, K., Doytchinova, I. A., Guan, P., Hattotuwigama, C. K., and Flower, D. R. (2005) Antijen: a quantitative immunology database integrating functional, thermodynamic, kinetic, biophysical, and cellular data, *Immunome Res.*, **1**, 4, <https://doi.org/10.1186/1745-7580-1-4>.
81. Peters, B., Sidney, J., Bourne, P., Bui, H. H., Buus, S., Doh, G., Fleri, W., Kronenberg, M., Kubo, R., Lund, O., Nemazee, D., Ponomarenko, J. V., Sathiamurthy, M., Schoenberger, S., Stewart, S., Surko, P., Way, S., Wilson, S., and Sette, A. (2005) The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint, *PLoS Biol.*, **3**, e91, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030091>.
82. Fleishman, S. J., Corn, J. E., Strauch, E. M., Whitehead, T. A., Karanicolas, J., and Baker, D. (2011) Hotspot-centric *de novo* design of protein binders, *J. Mol. Biol.*, **413**, 1047-1062, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.09.001>.
83. Fleishman, S. J., Whitehead, T. A., Ekiert, D. C., Dreyfus, C., Corn, J. E., Strauch, E. M., Wilson, I. A., and Baker, D. (2011) Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin, *Science*, **332**, 816-821, <https://doi.org/10.1126/science.1202617>.
84. Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **346**, 818-822, <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
85. Tuerk, C., and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, **249**, 505-510, <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.

86. Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., Kreneva, R. A., Perumov, D. A., and Nudler, E. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria, *Cell*, **111**, 747-756, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01134-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01134-0).
87. Sullenger, B. A., Gallardo, H. F., Ungers, G. E., and Gilboa, E. (1991) Analysis of trans-acting response decoy RNA-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transactivation, *J. Virol.*, **65**, 6811-6816, <https://doi.org/10.1128/JVI.65.12.6811-6816.1991>.
88. Chen, A., and Yang, S. (2015) Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay, *Biosens. Bioelectron.*, **71**, 230-242, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.041>.
89. Zhou, J., and Rossi, J. (2017) Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **16**, 181-202, <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>.
90. Cho, E. J., Lee, J. W., and Ellington, A. D. (2009) Applications of aptamers as sensors, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif.)*, **2**, 241-264, <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112851>.
91. Mahmoud, M., Deigner, H.-P., Mahmoud, M., and Deigner, H.-P. (2015/12/15) Aptamers in diagnostics: replacing or complementing antibodies? *J. Bioeng. Bioelectron.*, **5**, <https://doi.org/10.4172/2153-0777.1000e129>.
92. Ng, E. W., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Jr., Guyer, D. R., and Adamis, A. P. (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 123-132, <https://doi.org/10.1038/nrd1955>.
93. Kruspe, S., Mittelberger, F., Szameit, K., and Hahn, U. (2014) Aptamers as drug delivery vehicles, *ChemMedChem*, **9**, 1998-2011, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402163>.
94. Olson, W. C., Heston, W. D., and Rajasekaran, A. K. (2007) Clinical trials of cancer therapies targeting prostate-specific membrane antigen, *Rev. Recent Clin. Trials*, **2**, 182-190, <https://doi.org/10.2174/157488707781662724>.
95. Zhou, J., Swiderski, P., Li, H., Zhang, J., Neff, C. P., Akkina, R., and Rossi, J. J. (2009) Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3094-3109, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp185>.
96. Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., and Ruml, T. (2015) Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology, *Biotechnol. Adv.*, **33**, 1141-1161, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>.
97. Luo, X., McKeague, M., Pitre, S., Dumontier, M., Green, J., Golshani, A., Derosa, M. C., and Dehne, F. (2010) Computational approaches toward the design of pools for the *in vitro* selection of complex aptamers, *RNA*, **16**, 2252-2262, <https://doi.org/10.1261/rna.2102210>.
98. Gevertz, J., Gan, H. H., and Schlick, T. (2005) In vitro RNA random pools are not structurally diverse: a computational analysis, *RNA*, **11**, 853-863, <https://doi.org/10.1261/rna.7271405>.
99. Lipi, F., Chen, S., Chakravarthy, M., Rakesh, S., and Veedu, R. N. (2016) *In vitro* evolution of chemically-modified nucleic acid aptamers: Pros and cons, and comprehensive selection strategies, *RNA Biol.*, **13**, 1232-1245, <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1236173>.
100. Verma, V., Gupta, A., and Chaudhary, V. K. (2020) Emulsion PCR made easy, *BioTechniques*, **69**, 421-426, <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0161>.
101. Kohlberger, M., and Gadermaier, G. (2022) SELEX: critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **69**, 1771-1792, <https://doi.org/10.1002/bab.2244>.
102. Betz, K., Malyshev, D. A., Lavergne, T., Welte, W., Diederichs, K., Dwyer, T. J., Ordoukhanian, P., Romesberg, F. E., and Marx, A. (2012) KlenTaq polymerase replicates unnatural base pairs by inducing a Watson-Crick geometry, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 612-614, <https://doi.org/10.1038/nchembio.966>.
103. Boltz, A., Piater, B., Toleikis, L., Guenther, R., Kolmar, H., and Hock, B. (2011) Bi-specific aptamers mediating tumor cell lysis, *J. Biol. Chem.*, **286**, 21896-21905, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238261>.
104. Li, Y., and Breaker, R. R. (1999) Kinetics of RNA degradation by specific base catalysis of transesterification involving the 2'-hydroxyl group, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5364-5372, <https://doi.org/10.1021/ja990592p>.
105. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., and Behringer, R. (2007) General procedures for avoiding contamination with RNase, *CSH Protoc.*, **2007**, pdb ip43, <https://doi.org/10.1101/pdb.ip43>.
106. Darfeuille, F. (2004) LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3101-3107, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh636>.
107. Odeh, F., Nsairat, H., Alshaer, W., Ismail, M. A., Esawi, E., Qaqish, B., Bawab, A. A., and Ismail, S. I. (2019) Aptamers chemistry: chemical modifications and conjugation strategies, *Molecules*, **25**, 3, <https://doi.org/10.3390/molecules25010003>.
108. Chen, Z., Luo, H., Gubu, A., Yu, S., Zhang, H., Dai, H., Zhang, Y., Zhang, B., Ma, Y., Lu, A., and Zhang, G. (2023) Chemically modified aptamers for improving binding affinity to the target proteins via enhanced non-covalent bonding, *Front. Cell Dev. Biol.*, **11**, 1091809, <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1091809>.

109. Li, X., Chung, L. W., and Li, G. (2016) Multiscale simulations on spectral tuning and the photoisomerization mechanism in fluorescent RNA spinach, *J. Chem. Theory Comput.*, **12**, 5453-5464, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00578>.
110. Sato, R., Suzuki, K., Yasuda, Y., Suenaga, A., and Fukui, K. (2022) RNAapt3D: RNA aptamer 3D-structural modeling database, *Biophys. J.*, **121**, 4770-4776, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.09.023>.
111. Ahmad, N. A., Mohamed Zulkifli, R., Hussin, H., and Nadri, M. H. (2021) *In silico* approach for Post-SELEX DNA aptamers: a mini-review, *J. Mol. Graph. Model.*, **105**, 107872, <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2021.107872>.
112. Buglak, A. A., Samokhvalov, A. V., Zherdev, A. V., and Dzantiev, B. B. (2020) Methods and Applications of *In Silico* Aptamer Design and Modeling, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, <https://doi.org/10.3390/ijms21228420>.
113. Kumar, P., and Kumar, A. (2020) Nucleobase sequence based building up of reliable QSAR models with the index of ideality correlation using Monte Carlo method, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **38**, 3296-3306, <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1656109>.
114. Torkamanian-Afshar, M., Nematzadeh, S., Tabarzad, M., Najafi, A., Lanjanian, H., and Masoudi-Nejad, A. (2021) *In silico* design of novel aptamers utilizing a hybrid method of machine learning and genetic algorithm, *Mol. Divers.*, **25**, 1395-1407, <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10192-9>.
115. Bashir, A., Yang, Q., Wang, J., Hoyer, S., Chou, W., McLean, C., Davis, G., Gong, Q., Armstrong, Z., Jang, J., Kang, H., Pawlosky, A., Scott, A., Dahl, G. E., Berndt, M., Dimon, M., and Ferguson, B. S. (2021) Machine learning guided aptamer refinement and discovery, *Nat. Commun.*, **12**, 2366, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22555-9>.
116. Matarrese, M. A. G., Loppini, A., Nicoletti, M., Filippi, S., and Chiodo, L. (2023) Assessment of tools for RNA secondary structure prediction and extraction: a final-user perspective, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **41**, 6917-6936, <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2116110>.
117. Sato, K., Akiyama, M., and Sakakibara, Y. (2021) RNA secondary structure prediction using deep learning with thermodynamic integration, *Nat. Commun.*, **12**, 941, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21194-4>.
118. Nasaev, S. S., Mukanov, A. R., Kuznetsov, I. I., and Veselovsky, A. V. (2023) AliNA – a deep learning program for RNA secondary structure prediction, *Mol. Inform.*, **42**, e202300113, <https://doi.org/10.1002/minf.202300113>.
119. Khoshbin, Z., and Housaindokht, M. R. (2021) Computer-aided aptamer design for sulfadimethoxine antibiotic: step by step mutation based on MD simulation approach, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**, 3071-3079, <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1760133>.
120. Hsieh, P. C., Lin, H. T., Chen, W. Y., Tsai, J. J. P., and Hu, W. P. (2017) The combination of computational and biosensing technologies for selecting aptamer against prostate specific antigen, *Biomed. Res. Int.*, **2017**, 5041683, <https://doi.org/10.1155/2017/5041683>.
121. Shcherbinin, D. S., Gnedenko, O. V., Khmeleva, S. A., Usanov, S. A., Gilep, A. A., Yantsevich, A. V., Shkel, T. V., Yushkevich, I. V., Radko, S. P., Ivanov, A. S., Veselovsky, A. V., and Archakov, A. I. (2015) Computer-aided design of aptamers for cytochrome p450, *J. Struct. Biol.*, **191**, 112-119, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.003>.
122. Oliveira, R., Pinho, E., Sousa, A. L., Dias, O., Azevedo, N. F., and Almeida, C. (2022) Modelling aptamers with nucleic acid mimics (NAM): from sequence to three-dimensional docking, *PLoS One*, **17**, e0264701, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264701>.
123. Binet, T., Padiolleau-Lefevre, S., Octave, S., Avalle, B., and Maffucci, I. (2023) Comparative study of single-stranded oligonucleotides secondary structure prediction tools, *BMC Bioinformatics*, **24**, 422, <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05532-5>.
124. Zhao, Y., Huang, Y., Gong, Z., Wang, Y., Man, J., and Xiao, Y. (2012) Automated and fast building of three-dimensional RNA structures, *Sci. Rep.*, **2**, 734, <https://doi.org/10.1038/srep00734>.
125. Adler, A., Forster, N., Homann, M., and Goringe, H. U. (2008) Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **11**, 16-23, <https://doi.org/10.2174/138620708783398331>.
126. Galindo-Murillo, R., Cohen, J. S., and Akabayov, B. (2021) Molecular dynamics simulations of acyclic analogs of nucleic acids for antisense inhibition, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **23**, 527-535, <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.11.023>.
127. Sponer, J., Banas, P., Jurecka, P., Zgarbova, M., Kuhrova, P., Havrila, M., Krepl, M., Stadlbauer, P., and Otyepka, M. (2014) molecular dynamics simulations of nucleic acids. From tetranucleotides to the ribosome, *J. Phys. Chem. Lett.*, **5**, 1771-1782, <https://doi.org/10.1021/jz500557y>.
128. Wulff, G., Sarhan, A., and Zabrocki, K. (1973) Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates, *Tetrahedron Lett.*, **14**, 4329-4332, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)87213-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)87213-0).
129. Haupt, K., Medina Rangel, P. X., and Bui, B. T. S. (2020) Molecularly imprinted polymers: antibody mimics for bioimaging and therapy, *Chem. Rev.*, **120**, 9554-9582, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00428>.
130. Шумянцева В. В., Булко Т. В., Байчоров И. Х., Арчаков А. И. (2015) Полимерные антитела (МИП) в электроанализе белков, *Биомедицинская химия*, **61**, 325-331, <https://doi.org/10.18097/PBMC20156103325>.

131. Peeters, M., Eersels, K., Junkers, T., and Wagner, P. (2016) *Molecularly Imprinted Polymers: Synthetic Receptors for Diagnostic Medical Devices*, Elsevier, Amsterdam
132. Bossi, A., Bonini, F., Turner, A. P., and Piletsky, S. A. (2007) Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1131-1137, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.023>.
133. Scorrano, S., Mergola, L., Del Sole, R., and Vasapollo, G. (2011) Synthesis of molecularly imprinted polymers for amino acid derivatives by using different functional monomers, *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 1735-1743, <https://doi.org/10.3390/ijms12031735>.
134. Piletsky, S. A., Turner, N. W., and Laitenberger, P. (2006) Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics – future potential and existing problems, *Med. Eng. Phys.*, **28**, 971-977, <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2006.05.004>.
135. Puoci, F., Iemma, F., and Picci, N. (2008) Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers for drug delivery: a review, *Curr. Drug Deliv.*, **5**, 85-96, <https://doi.org/10.2174/156720108783954888>.
136. Emi Shaqiza, A., Mohd Noor, A., Islam, A. K. M. S., Dahyar, A., and Iqmal, T. (2011) Porogen effect towards the quality of curcumin imprinted polymer, *Indones. J. Chem.*, **11**, 207-211, <https://doi.org/10.22146/ijc.21381>.
137. Ramstrom, O., and Mosbach, K. (1999) Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 759-764, [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)00037-x](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(99)00037-x).
138. Parisi, O. I., Francomano, F., Dattilo, M., Patitucci, F., Prete, S., Amone, F., and Puoci, F. (2022) The evolution of molecular recognition: from antibodies to molecularly imprinted polymers (MIPs) as artificial counterpart, *J. Funct. Biomater.*, **13**, 12, <https://doi.org/10.3390/jfb13010012>.
139. Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., and Mele, G. (2011) Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 5908-5945, <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>.
140. Dirion, B., Cobb, Z., Schillinger, E., Andersson, L. I., and Sellergren, B. (2003) Water-compatible molecularly imprinted polymers obtained via high-throughput synthesis and experimental design, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15101-15109, <https://doi.org/10.1021/ja0355473>.
141. Hoshino, Y., Kodama, T., Okahata, Y., and Shea, K. J. (2008) Peptide imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 15242-15243, <https://doi.org/10.1021/ja8062875>.
142. Lee, M.-H., Thomas, J. L., Liao, C.-L., Jurcevic, S., Crnogorac-Jurcevic, T., and Lin, H.-Y. (2017) Polymers imprinted with three REG1B peptides for electrochemical determination of Regenerating Protein 1B, a urinary biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma, *Microchim. Acta*, **184**, 1773-1780, <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2169-4>.
143. Urraca, J. L., Hall, A. J., Moreno-Bondi, M. C., and Sellergren, B. (2006) A stoichiometric molecularly imprinted polymer for the class-selective recognition of antibiotics in aqueous media, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **45**, 5158-5161, <https://doi.org/10.1002/anie.200601636>.
144. Xu, R., Tian, J., Guan, Y., and Zhang, Y. (2019) Peptide-cross-linked protein-imprinted polymers: easy template removal and excellent imprinting effect, *CCS Chem.*, **1**, 544-552, <https://doi.org/doi:10.31635/ccschem.019.20190030>.
145. Ansari, S., and Masoum, S. (2019) Molecularly imprinted polymers for capturing and sensing proteins: current progress and future implications, *Trends Anal. Chem.*, **114**, 29-47, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.008>.
146. Rajpal, S., Mishra, P., and Mizaikoff, B. (2023) Rational *in silico* design of molecularly imprinted polymers: current challenges and future potential, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 6785, <https://doi.org/10.3390/ijms24076785>.
147. Nicholls, I. A., Golker, K., Olsson, G. D., Suriyanarayanan, S., and Wiklander, J. G. (2021) The use of computational methods for the development of molecularly imprinted polymers, *Polymers (Basel)*, **13**, 2841, <https://doi.org/10.3390/polym13172841>.
148. Liu, Z., Xu, Z., Wang, D., Yang, Y., Duan, Y., Ma, L., Lin, T., and Liu, H. (2021) A review on molecularly imprinted polymers preparation by computational simulation-aided methods, *Polymers (Basel)*, **13**, 2657, <https://doi.org/10.3390/polym13162657>.
149. Olsson, G. D., Wiklander, J. G., and Nicholls, I. A. (2021) Using molecular dynamics in the study of molecularly imprinted polymers, *Methods Mol. Biol.*, **2359**, 241-268, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1629-1_21.
150. Douykhunlaw, C., and Sutthibutpong, T. (2022) A molecular dynamics study on the diffusion and imprint ability of spectinomycin under different sizes of aniline oligomers, *J. Mol. Model.*, **28**, 387, <https://doi.org/10.1007/s00894-022-05371-w>.
151. Suryana, S., Mutakin, M., Rosandi, Y., and Hasanah, A. N. (2022) Molecular dynamic study of mechanism underlying nature of molecular recognition and the role of crosslinker in the synthesis of salmeterol-targeting molecularly imprinted polymer for analysis of salmeterol xinafoate in biological fluid, *Molecules*, **27**, 3619, <https://doi.org/10.3390/molecules27113619>.
152. Rebelo, P., Pacheco, J. G., Voroshlylova, I. V., Seguro, I., Cordeiro, M., and Delerue-Matos, C. (2022) Computational modelling and sustainable synthesis of a highly selective electrochemical MIP-based sensor for citalopram detection, *Molecules*, **27**, 3315, <https://doi.org/10.3390/molecules27103315>.

153. Daniels, E., Mustafa, Y. L., Herdes, C., and Leese, H. S. (2021) Optimization of cortisol-selective molecularly imprinted polymers enabled by molecular dynamics simulations, *ACS Appl. Bio Mater.*, **4**, 7243-7253, <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00774>.
154. Garcia, Y., Usuga, B. A., Campos, C. H., Alderete, J. B., and Jimenez, V. A. (2021) NanoMIPs design for fucose and mannose recognition: a molecular dynamics approach, *J. Chem. Inf. Model.*, **61**, 2048-2061, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01446>.
155. Chianella, I., Lotierzo, M., Piletsky, S. A., Tothill, I. E., Chen, B., Karim, K., and Turner, A. P. (2002) Rational design of a polymer specific for microcystin-LR using a computational approach, *Anal. Chem.*, **74**, 1288-1293, <https://doi.org/10.1021/ac010840b>.
156. Karlsson, B. C., O'Mahony, J., Karlsson, J. G., Bengtsson, H., Eriksson, L. A., and Nicholls, I. A. (2009) Structure and dynamics of monomer-template complexation: an explanation for molecularly imprinted polymer recognition site heterogeneity, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13297-13304, <https://doi.org/10.1021/ja902087t>.
157. Nicholls, I. A., Andersson, H. S., Charlton, C., Henschel, H., Karlsson, B. C., Karlsson, J. G., O'Mahony, J., Rosengren, A. M., Rosengren, K. J., and Wikman, S. (2009) Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design, *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 543-552, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.03.038>.
158. Kryscio, D. R., Shi, Y., Ren, P., and Peppas, N. A. (2011) Molecular docking simulations for macromolecularly imprinted polymers, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **50**, 13877-13884, <https://doi.org/10.1021/ie201858n>.
159. Sullivan, M. V., Dennison, S. R., Archontis, G., Reddy, S. M., and Hayes, J. M. (2019) Toward rational design of selective molecularly imprinted polymers (MIPs) for proteins: computational and experimental studies of acrylamide based polymers for myoglobin, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 5432-5443, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b03091>.
160. Boroznjak, R., Reut, J., Tretjakov, A., Lomaka, A., Opik, A., and Syritski, V. (2017) A computational approach to study functional monomer-protein molecular interactions to optimize protein molecular imprinting, *J. Mol. Recognit.*, **30**, <https://doi.org/10.1002/jmr.2635>.
161. Hsu, C. Y., Lin, H. Y., Thomas, J. L., Wu, B. T., and Chou, T. C. (2006) Incorporation of styrene enhances recognition of ribonuclease A by molecularly imprinted polymers, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 355-363, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.05.008>.
162. Mazouz, Z., Mokni, M., Fourati, N., Zerrouki, C., Barbault, F., Seydou, M., Kalfat, R., Yaakoubi, N., Omezzine, A., Bouslema, A., and Othmane, A. (2020) Computational approach and electrochemical measurements for protein detection with MIP-based sensor, *Biosens. Bioelectron.*, **151**, 111978, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111978>.
163. Dhinesh Kumar, M., Karthikeyan, M., Kaniraja, G., Muthukumar, K., Muneeswaran, G., and Karunakaran, C. (2024) Computational modelling and optimization studies of electropentamer for molecular imprinting of DJ-1, *J. Mol. Graph. Model.*, **128**, 108715, <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2024.108715>.
164. Cubuk, H., Ozbil, M., and Cakir Hatir, P. (2021) Computational analysis of functional monomers used in molecular imprinting for promising COVID-19 detection, *Comput. Theor. Chem.*, **1199**, 113215, <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2021.113215>.
165. Rajpal, S., and Mizaikoff, B. (2022) An *in silico* predictive method to select multi-monomer combinations for peptide imprinting, *J. Mater. Chem. B*, **10**, 6618-6626, <https://doi.org/10.1039/d2tb00418f>.
166. Lowdon, J. W., Ishikura, H., Kvernenes, M. K., Caldara, M., Cleij, T. J., van Grinsven, B., Eersels, K., and Diliën, H. (2021) Identifying potential machine learning algorithms for the simulation of binding affinities to molecularly imprinted polymers, *Computation*, **9**, 103, <https://doi.org/10.3390/computation9100103>.

CURRENT METHODS OF MOLECULAR MODELING IN THE DEVELOPMENT OF AFFINE AND SPECIFIC AGENTS BINDING PROTEINS

Review

**Sh. S. Nasaev¹, A. R. Mukanov¹, I. V. Mishkorez^{1,2}, I. I. Kuznetsov¹, I. V. Leibin³,
V. A. Dolgusheva¹, G. A. Pavlyuk¹, A. L. Manasyan¹, and A. V. Veselovsky^{2*}**

¹ R&D Department, Xelari Ltd., 121601 Moscow, Russia

² Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia; e-mail: veselov@ibmh.msk.su

³ Skolkovo Institute of Science and Technology, 121205 Moscow, Russia

High-affinity and specific agents are widely applied in various areas, including diagnostics, scientific research, and disease therapy (as drugs and drug delivery systems). It takes significant time to develop them. For this reason, development of high-affinity agents extensively utilizes computer methods at various stages for the analysis and modeling of these molecules. The review describes the main affinity and specific agents, such as monoclonal antibodies and their fragments, antibody mimetics, aptamers, and molecularly imprinted polymers. The methods of their obtaining as well as their main advantages and disadvantages are briefly described, with special attention focused on the molecular modeling methods used for their analysis and development.

Keywords: antibody, antibody mimetics, aptamers, molecularly imprinted polymers, molecular modeling