

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Petra Dobešová

Proteinové domény využitelné k vývoji vazebných molekul
Protein domains utilizable for development of binding molecules

Bakalářská práce

Vedoucí práce:
RNDr. Petr Malý, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1.5.2017

Petra Dobešová

Abstrakt: Malé proteinové domény jsou základními stavebními jednotkami v přírodě se vyskytujícími proteinů. Mnohé z těchto domén vynikají svou stabilitou a absencí disulfidických vazeb, a proto se jejich struktury stávají atraktivními nástroji pro tvorbu uměle vytvářených vazebných molekul. Prvním krokem k vytvoření nových typů vazebných proteinů je nalezení základní nosné a neměnné struktury dané domény, tzv. scaffoldu, která se určí počítačovým modelováním s následnou identifikací vyměnitelných aminokyselinových zbytků. Tím je definován sekvenční rámec pro konstrukci vysoce komplexní kombinatoriální knihovny, která slouží jako výchozí nástroj k cílené selekci požadovaných vazebných variant. V závislosti na použité selekční technice jsou jednotlivé varianty proteinu testovány na schopnost vázat zvolenou cílovou molekulu s vysokou specifitou a afinitou. Malé proteinové molekuly postrádají posttranslační modifikace, jsou teplotně stabilní, odolné proti řadě organických činidel a mohou být produkovány ve velkém množství v bakteriích. Jejich výhodou je snadná modifikovatelnost, a díky malé velikosti i vysoká pronikavost tkáněmi. Pro tyto vlastnosti jsou malé vazebné proteiny užitečným nástrojem pro nové biotechnologie a perspektivní alternativou k monoklonálním protilátkám. Cílem předložené bakalářské práce je shrnout poznatky o malých vazebných proteinech a poskytnout přehled o hlavních scaffoldech odvozených od proteinových domén.

Klíčová slova: protilátka, proteinová doména, vazebný protein, kombinatoriální knihovna, selekční metody

Abstract: Small protein domains represent basic building blocks of naturally occurring proteins. Many of them exhibit excellent stability, lack disulfide bonds and their structures, therefore, represent attractive tools for generation of artificial binding molecules. First step in the production of novel binding proteins is the definition of a basic domain structure, called “scaffold”, which is identified using *in silico* approaches, resulting in discovery of mutable amino acid residues. Then, randomization of such residues leads to design of a highly complex combinatorial library as a key tool for targeted selection of protein variants. Based on chosen selection approach, the particular protein variants can be tested for their ability to recognize the target molecule with high specificity and binding affinity. Small binding proteins lack post-translation modifications, exhibit thermal stability, are resistant to many organic solvents and can be produced on a mass scale in bacterial host cells. In addition, they can be easily modified and used *in vivo* with excellent tissue penetration. Due to these beneficial properties, small artificial binding proteins are extraordinary useful biotechnological tools and represent a promising alternative to monoclonal antibodies. The aim of this work is to summarize our knowledge on small binding proteins and provide an overview of basic types of protein scaffolds.

Keywords: antibody, protein domain, binding protein, combinatorial library, selection approaches

Seznam použitých zkratk:

ABD	albumin vázající doména
AR	z angl. Ankyrin repeat
BC, DE, FG	smyčky ¹⁰ FN3 domény
CD28	z angl. Cluster od Differentiation 28
cDNA	komplementární DNA syntetizovaná reverzní transkripcí podle RNA
CDR1, CDR2, CDR3	komplementaritu určující oblasti protilátek
c-MET	tyrozin proteinkináza MET
DARPin	z angl. Designed ankyrin repeat proteins
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED-B	extradoména B fibronektinu
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová a její soli
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ELISA	z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ErbB3	receptor pro epidermální růstový faktor 3
Fab fragment	antigen vázající fragment protilátek
FACS	průtoková cytometrie z angl. Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fc fragment	z angl. Fragment crystallizable region
GA modul	z angl. Protein G-related albumin-binding module
GDF-11	růstový diferenciační faktor 11
GDF-8	růstový diferenciační faktor 8
gp120	glykoprotein 120, obalový protein viru HIV
Grb2	z angl. Growth factor receptor-bound protein 2
HER 3	receptor 3 pro lidský epidermální růstový faktor
HRP	křenová peroxidáza
ILP	vazebný protein odvozený od ABD domény vázající IL-23
JNK2	z angl. C-Jun N-terminal kinase 2
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NIR	z angl. Near-infrared spectroscopy
OB fold	oligonukleotidy/oligosacharidy vázající fold
PAB	vazebný protein odvozený od ABD domény vázající PSP94
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
REX	vazebný protein odvozený od ABD domény vázající IL-23R
RNA	ribonukleová kyselina
SUMO	z angl. Small ubiquitin-like modifier
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VH	variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinů

Obsah

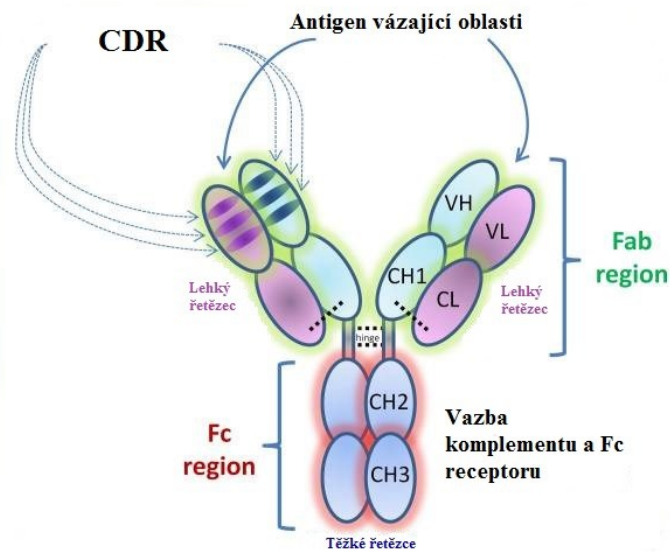
1	Úvod.....	1
2	Design kombinatoriálních knihoven a selekční metody	2
2.1	Metody randomizace	3
2.2	Ribozomální displej.....	4
2.3	mRNA displej	5
2.4	Kvasinkový displej.....	7
2.5	Fágový displej	8
2.6	Bakteriální displej	9
3	Albumin vazebná doména (ABD)	10
3.1	Charakteristika	10
3.2	ABD jako scaffold.....	11
3.2.1	Vazebné molekuly proti lidskému interferonu gama (hIFN γ).....	11
3.2.2	Tvorba bispecifických ABD molekul.....	11
3.2.3	Vazebné proteiny cílené na molekuly IL-23R a IL-23.....	12
4	Affibody molekuly.....	14
4.1	Charakteristika	14
4.2	Chemická syntéza.....	15
4.3	Optické zobrazovací metody.....	15
4.4	Syntéza a využití	15
5	DARPin molekuly	16
5.1	Charakteristika	16
5.2	DARPiny jako scaffold.....	17
5.3	Využití	17
5.3.1	DARPiny vázající molekuly VEGF-A	17
5.3.2	DARPiny blokující HGF a VEGF.....	18
5.3.3	DARPiny s aktivitou proti HER receptoru.....	18

6	Anticaliny (Affiliny).....	19
6.1	Charakteristika	19
6.2	Selekce BBP vazebných variant.....	19
6.3	Selekce hemoglobin vazebných molekul.....	19
6.4	Využití	21
6.4.1	Anticaliny cílené proti ED-B doméně onkofetálního fibronektinu.....	21
6.4.2	Selekce Anticalinů s afinitami vůči PMSA (prostatický specifický membránový antigen) 21	
6.5	Anticaliny v klinických testech.....	22
7	Adnectiny	22
7.1	Charakteristika	22
7.2	Izolace FN3 mutantů vážících nové ligandy.....	23
7.3	Adnectiny jako vazebné molekuly	23
7.3.1	Adnectiny cílené na molekuly myostatinu	23
7.3.2	Inhibitor VEGFR-2	24
7.3.3	Další příklady cílových molekul Adnectinů	24
8	Fynomery	25
8.1	Design lidské Fyn SH3 fágové knihovny a selekce ED-B vazebných proteinů	25
8.2	Fynomery a cílové molekuly	26
9	Nové scaffoldy.....	27
9.1	Adhiron.....	27
9.2	Alphabody.....	28
9.3	Centyriny	29
9.4	Repebody	29
9.5	OBody.....	30
10	Další typy scaffoldů	31
11	Závěr	32

12 Reference.....33

1 Úvod

Monoklonální protilátky (mAbs) neboli imunoglobuliny (Igs), jako je imunoglobulin A, E a G (IgA, IgE a IgG), jsou velké multidoménové heterodimerní molekuly o velikosti 150 kDa sestávající z těžkého a lehkého řetězce a šesti různých domén (V_H , V_L , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} a C_L), schopné aktivovat imunitní reakce systému. mAbs jsou bivalentní vazebné struktury, které velmi specificky váží svůj cíl s vysokou afinitou, mají původ v lidském organismu a vynikají dlouhým poločasem života. Díky svým vlastnostem se jedná o skupinu rychle se rozvíjejících terapeutik.



Obrázek 1 (upraveno) – Struktura monoklonální protilátky. Imunoglobuliny sestávají ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců spojených disulfidickými můstky. Těžký řetězec obsahuje variabilní doménu V_H a tři, nebo čtyři konstantní domény C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} a C_{H4} . Lehký řetězec obsahuje pouze jednu variabilní doménu V_L a jednu konstantní doménu C_L . V Fab oblasti tvoří V_H doména s V_L doménou vazebné místo pro antigen. Vazebná oblast je určena pomocí CDR komplementaritu určujících oblastí. Fc oblast protilátky zajišťuje interakce s komplementem a Fc receptorem (Flego et al., 2013).

Monoklonální protilátky ovšem vzhledem ke své stavbě čelí mnoha překážkám a limitům v jejich produkci a využití. Správné složení mAbs a jejich celková stabilita vyžaduje přítomnost disulfidických můstků, které se ovšem vytvářejí pouze v oxidativním prostředí a v redukčních podmínkách jsou velmi vzácné. Mezi další nevýhodné aspekty monoklonálních protilátek patří jejich značná velikost, závislost na posttranslační glykosylaci těžkého řetězce a nízká termodynamická stabilita. Produkce mAbs je velmi komplikovaná a finančně náročná (Vazquez-Lombardi et al., 2015). V důsledku toho začaly být izolovány a využívány k vazbě antigenu fragmenty protilátek, jako je Fab fragment. Později se výzkum zaměřil na vývoj neimunoglobulinových proteinů vyznačujících se vlastnostmi podobnými vlastnostem protilátek.

Vazebné proteiny založené na struktuře scaffoldu představují atraktivní molekuly s novými funkcemi nacházející široké uplatnění ve výzkumu, zobrazovacích metodách a klinických aplikacích jako potenciální alternativy k rekombinantním protilátkám. Díky pokrokům v tvorbě rozsáhlých kombinatoriálních knihoven variant proteinů a pokročilých selekčních technologií byly získány velmi specifické a vysoce afinní vazebné molekuly vůči konkrétním cílovým strukturám využitelné k diagnostice či terapii různých onemocnění. Hlavním cílem vývoje nových scaffoldů k selekci vysoce specifických vazebných struktur je tvorba molekul schopných narušit původní interakce mezi proteiny vytvářením nových vazeb. Vazebné proteiny jsou zpravidla malé jednodoménové monomerní struktury vyznačující se vysokou stabilitou v širokém spektru pH a teplot, postrádají disulfidické můstky, nevyžadují posttranslační modifikace a mohou být produkovány ve velkém množství v bakteriích (**Gebauer and Skerra, 2009**).

2 Design kombinatoriálních knihoven a selekční metody

Řízená evoluce molekul a kombinatoriální metody představují významné techniky proteinového inženýrství umožňující vytvářet molekuly s optimalizovanými vlastnostmi, funkcemi a strukturami. Aplikací metod proteinového inženýrství jsou vytvářeny proteiny s požadovanými aktivitami, jako je zvýšená vazebná afinita, stabilita proteinu či specifita enzymu. V procesu řízené evoluce proteinů jsou jednotlivé varianty molekul vytvářeny pomocí náhodných nebo cílených mutací a specifické molekuly jsou následně získávány selekčními metodami z rozsáhlých knihoven. Selekční metody, tzv. displeje, jsou založeny na přímém spojení mezi molekulou proteinu a její DNA sekvencí. DNA sekvence dané proteinové varianty umožňuje určit, která aminokyselinová záměna způsobila pozorovaný fenotyp (**Neylon, 2004**).

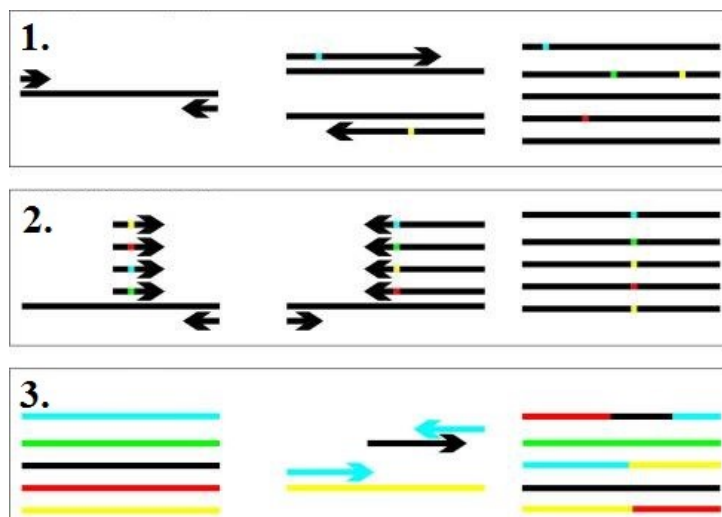
Vysoce komplexní kombinatoriální knihovny proteinových variant se vytvářejí z vybraných struktur malých proteinových domén, scaffoldů. Pozice aminokyselin v polypeptidovém řetězci proteinu vhodné k randomizaci se určují pomocí analýzy *in silico*, která na principu výpočtu volné energie nahrazuje každý analyzovaný aminokyselinový zbytek v sekvenci scaffoldu za alanin (tzv. alanine scanning) nebo jinou zvolenou aminokyselinu. Tato metoda umožňuje lokalizovat pozice zajišťující stabilitu proteinu a pozice, které mohou být randomizovány, aniž by došlo k narušení celkové topologie molekuly. Tímto postupem se také určí maximálně

přípustný počet vyměnitelných aminokyselinových pozic, a tím i celková teoretická komplexita vzniklé knihovny (Weiss et al., 2000).

Randomizovaná knihovna mutantní klonů je vytvořena syntézou genu *de novo* a jeho amplifikací pomocí PCR. Alternativní nukleotidy jsou zabudovávány do specifických pozic v DNA sekvenci v průběhu syntézy genu. Výsledkem je velké množství dvouřetězcových DNA molekul, z nichž každá představuje odlišnou variantu původního genu. Směs sekvencí představuje DNA knihovnu daného proteinu (Wang et al., 2006).

2.1 Metody randomizace

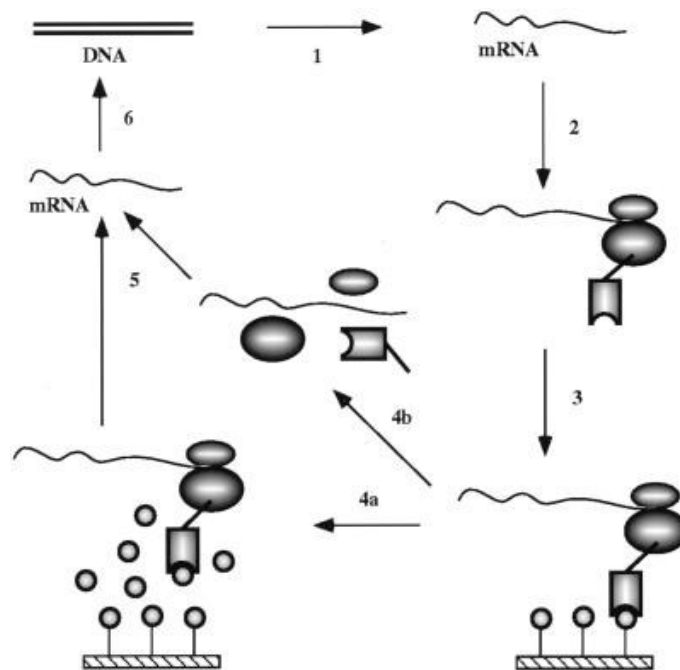
Nejprve je vytvořena počáteční knihovna tvořená širokým spektrem různých variant sekvencí nukleových kyselin odpovídajících konkrétnímu proteinu. Protein kódující DNA knihovna různých variant může být konstruována na základě vytvoření diverzity mezi jednotlivými sekvencemi pomocí bodových mutací, inzercí a delecí. Tyto mutace mohou být způsobeny náhodně v rámci celého genu (nejčastěji působením chemických a fyzikálních mutagenů) nebo dochází k randomizaci na specifických pozicích v sekvenci genu. Na základě těchto metod vznikají směsi DNA molekul. K dosažení diverzity mezi DNA molekulami tvořícími knihovnu není vždy nutno vytvářet nové protein kódující sekvence, ale můžeme použít kombinace již existujících sekvencí. Následně jsou v každém selekčním kole konstruovány další knihovny v závislosti na vybrané technologii (Neylon, 2004).



Obrázek 2 (upraveno) – Přehled metod randomizace DNA sekvencí. 1. Metoda náhodné mutagenese probíhá v rámci celého genu. 2. Řízená metoda umožňuje randomizovat konkrétní pozice. 3. U rekombinantní metody dochází k randomizaci nejen působením náhodných mutací, ale i rekombinací s jinou DNA sekvencí (Neylon, 2004).

2.2 Ribozomální displej

Syntetické DNA knihovny uchovávají informaci o sekvenční diverzitě konkrétního proteinu. Pro získání této informace je potřeba knihovnu vpravit do bakteriálních nebo eukaryotických buněk tak, aby mohlo docházet k jejich replikaci a amplifikaci. Následně lze z hostitelských buněk izolovat slibné proteinové varianty se specifitami vůči požadovaným cílům. Tato metoda vyžaduje opakování procesu *in vitro* diverzifikace a *in vivo* skríninku. Ribozomální displej představuje ideální metodu pro řízenou evoluci proteinů skrze velké množství generací bez nutnosti provádět složitý proces přechodu mezi *in vitro* a *in vivo* systémem. V případě ribozomálního displeje je replikace i amplifikace prováděna pomocí polymerázové reakce PCR *in vitro*. Molekula proteinu se dokáže správně sbalit do své nativní struktury až poté, co je kompletně nasyntetizována. Translace tudíž musí dosáhnout až samotného konce mRNA molekuly. mRNA sekvence u ribozomálního displeje postrádají stop kodony. Díky tomu vznikají ternární komplexy (mRNA-protein-ribozom) tvořené mRNA nekovalentně spojenou se správně sbaleným proteinem skrze ribozom. Nativní DNA knihovna sekvencí daného proteinu je amplifikována pomocí PCR a transkribována do RNA. Po následné purifikaci je vzniklá mRNA translatována *in vitro*, translace je zastavena ochlazením systému na ledu a zvýšením koncentrace Mg^{2+} dochází ke stabilizaci ribozomálního komplexu. Cílová molekula proteinu je imobilizována a využita pro selekci pozitivních ribozomálních komplexů specificky vážících svůj ligand, ostatní komplexy ribozomů jsou odmyty. Ribozomální komplexy mohou být eluovány spolu s ligandy, případně v disociované formě s využitím EDTA. RNA pozitivních klonů je izolována, transkribována do cDNA metodou reverzní transkripce a amplifikována s využitím PCR. Získaná DNA může být použita pro další kolo ribozomálního displeje, případně analyzována klonováním a sekvenací, nebo metodou ELISA (**Hanes and Pluckthun, 1997**).



Obrázek 3 – Schématické znázornění ribozomálního displeje.

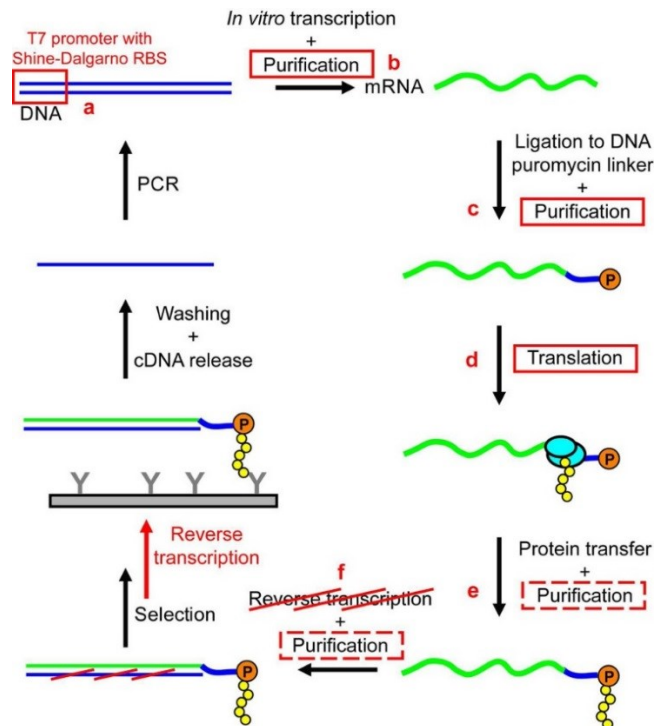
1. DNA knihovna sekvencí proteinu je transkribována do mRNA. 2. Translace na ribozomu je po nasyntetizování kompletního proteinu zastavena ochlazením na ledu a vzniká ribozomální komplex mRNA, ribozomu a správně sbaleného proteinu stabilizovaný přidáním Mg^{2+} . 3. Imobilizovaná cílová molekula je využita k selekci pozitivních vazebných variant. Nespecifické komplexy jsou odmyty. 4a. Ribozomální komplexy jsou eluovány společně s cílovými molekulami. 4b. Ribozomální komplexy jsou disociovány pomocí EDTA a eluovány. 5. mRNA pozitivních vazebných molekul je izolována. 6. Reverzní transkripcí mRNA je získána cDNA kolekce sekvencí, která může být následně analyzována pomocí klonování a sekvenace, či ELISA, nebo může být použita k dalšímu kolu ribozomálního displeje (Hanes and Pluckthun, 1997).

2.3 mRNA displej

Řízená evoluce proteinů vyžaduje pro další analýzu po translaci možnost získat molekuly spolu s jejich DNA sekvencemi. V případě selekční metody mRNA displeje byl vytvořen jednoduchý systém zajišťující stabilní kovalentní spojení proteinu či peptidu s vlastní mRNA. RNA molekula nemá v tomto případě jen mediátorovou funkci, ale představuje chimérní strukturu, která zároveň funguje jako adaptorová molekula. Na konci translace proteinu či peptidu adaptorová molekula vstoupí do ribozomu (na jeho A místo) a dochází k vytvoření kovalentní vazby mezi mRNA a proteinem. K vytvoření takové chimérní struktury se používá mRNA, na jejímž 3'konci se nachází puromycin. Puromycin je antibiotikum mimikující aminoacylový konec tRNA, v rámci peptidyl transferázové aktivity ribozomu se váže na nascentní peptid a funguje jako inhibitor translace. Produktem translace je tedy fúzní molekula, vysoce stabilní selekční částice, využitelná při *in vitro* selekci probíhající v podmínkách, které nejsou vhodné pro ribozomální displej.

Výhodou této metody je, že na rozdíl od například fágového displeje závislého na procesech prováděných *in vivo*, transkripce i translace probíhají zcela *in vitro*. *In vitro* metody, jako je právě mRNA nebo ribozomální displej, mají potenciál vytvářet komplexnější DNA knihovny **(Roberts and Szostak, 1997)**.

I přestože má mRNA displej široký potenciál využití v proteinovém inženýrství a poskytuje vysoce komplexní knihovny (čítající na 10^{14} členů), je pro svou technickou náročnost málo dostupnou metodou. Zjednodušení této technologie bylo docíleno na základě několika modifikací (viz Obrázek 4). Členové DNA knihovny pro mRNA displej jsou vytvořeni syntézou *de novo* a amplifikací pomocí PCR. Po transkripci a purifikaci je mRNA pomocí DNA ligázy spojena s DNA linkerem obsahujícím na svém 3' konci puromycin. Po translaci proteinu následuje selekční proces. Některé varianty proteinů se váží na vybrané imobilizované cílové molekuly. Selektované proteiny jsou skrze svou mRNA sekvenci reverzní transkripcí převedeny do sekvence cDNA a amplifikovány pomocí PCR reakce. Zjednodušený protokol pro mRNA displej umožňuje provést jedno kolo selekce za dva dny, namísto původních čtyř až sedmi dní. Provedení reverzní transkripce až po selekci brání polypeptidy před denaturací vysokou teplotou **(Barendt et al., 2013)**.



Obrázek 4 – Zjednodušení standardního protokolu pro mRNA displej. Modifikace jsou znázorněny červeně.

a) 5' konec DNA konstruktů byl upraven tak, aby obsahoval T7 promotor a Shine-Dalgarno vazebnou oblast pro ribozom (RBS). b) mRNA je namísto purifikace s využitím zdlouhavé denaturační PAGE metody purifikována pomocí chloridu lithného (LiCl). c) Purifikace komplexu mRNA-DNA-puromycin probíhá pomocí ultrafiltrace namísto PAGE purifikace. d) In vitro translace pomocí PURExpressTM umožňuje získat knihovnu s větší diverzitou a snížit nukleázovou a proteázovou aktivitu. e) Použití PURExpressTM snižuje nutnost provedení purifikačního kroku. f) Reverzní transkripce selekčních částic je prováděna až po selekčním kroku. Zároveň je možné se vyhnout dalšímu kroku purifikace a inkubace za vysoké teploty, která je nutná pro reverzní transkripci. Po reverzní transkripci do cDNA dochází k amplifikaci cDNA pomocí PCR reakce. Vzniklá knihovna může být použita k dalšímu kolu mRNA displeje (Barendt et al., 2013).

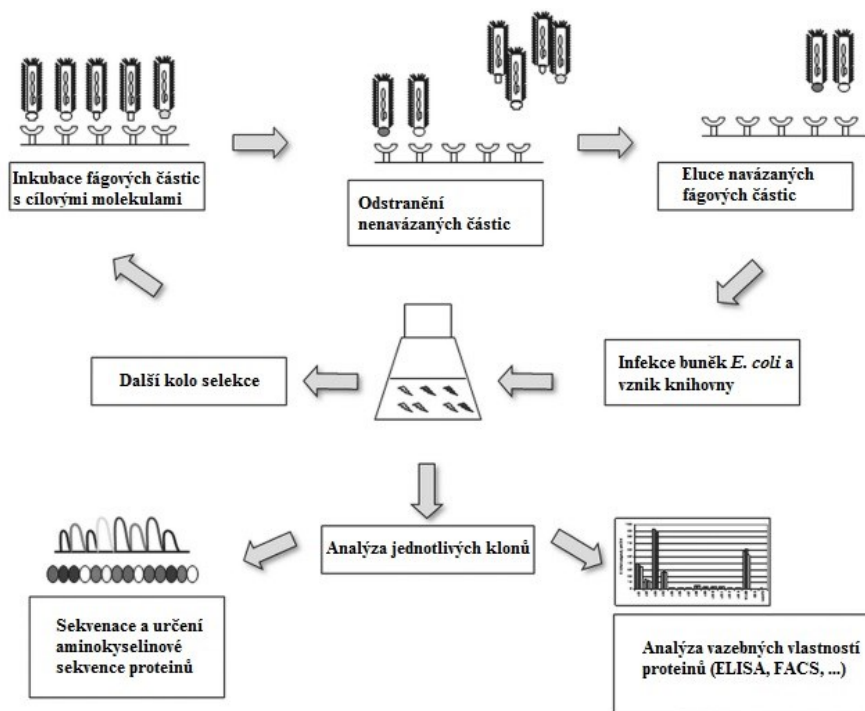
2.4 Kvasinkový displej

Kvasinkový displej (YSD, z angl. Yeast surface display) představuje technologii, jejíž význam spočívá v produkci peptidů nebo proteinů a jejich vystavení na buněčném povrchu kvasinek, jako je například *Saccharomyces cerevisiae* (Andreu and Del Olmo, 2017). Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické organismy, které lze snadno pěstovat, a jejichž proteinová sekreční dráha je podobná sekreční dráze u savčích buněk (Boder and Wittrup, 1997). Vnější vrstva buněčné stěny je tvořena převážně proteiny, z nichž některé jsou navázány kovalentní vazbou přes glykosylfosfatidylinositol (GPI) vytvářející hydrofobní membránovou kotvu. Vytvoření fúzní molekuly genetickým spojením DNA sekvence požadovaného proteinu/peptidu s DNA sekvencí pro protein ukotvený v buněčné stěně kvasinky umožňuje vystavit daný protein/peptid na povrchu buňky. Kotvicí protein navíc obvykle obsahuje epitop usnadňující detekci požadované částice. I ve formě fúzní molekuly si vystavený protein zachovává své vlastnosti, jako je například schopnost vytvářet interakce s dalšími proteiny či molekulami. Expres

proteinu na eukaryotickém buněčném povrchu může být detekována pomocí fluorescenční mikroskopie nebo FACS umožňující analyzovat vlastnosti vazebné molekuly bez nutnosti produkce solubilního proteinu a jeho purifikace (**Andreu and Del Olmo, 2017**). Výhodou kvasinkového displeje je možnost produkce savčích proteinů, které pro svou správnou funkci a aktivitu vyžadují specifické posttranslační úpravy v endoplasmatickém retikulu. Mezi takové proteiny patří například protilátky, receptorové proteiny nebo cytokiny (**Boder and Wittrup, 1997**).

2.5 Fágový displej

Technologie fágového displeje spočívá v expresi cizích peptidů nebo proteinů tvořících součást rekombinantních proteinů vystavovaných na povrchu fága. Gen kódující konkrétní cizí protein je vložen do fágového genu pro protein vyskytující se jako součást fágové kapsidy. Výsledkem je produkce cizího proteinu a jeho vystavení na povrchu fága (**Smith, 1985**). Vzhledem k tomu, že kapsida tvořená proteiny a jejich kódující sekvence jsou součástí fága, dochází k přímému spojení proteinu s jeho DNA sekvencí. Pokud je randomizovaná DNA knihovna proteinu vložena do fágových částic tak, aby každý fág obsahoval přesně jednu DNA sekvenci proteinu, vzniká fágová peptidová, nebo proteinová knihovna obsahující široké spektrum různých variant daného proteinu. Fágové částice mohou být testovány pro svou schopnost vázat vybrané cílové molekuly. Selektce pozitivních fágových částic, a tudíž pozitivních variant daného vazebného proteinu vystaveného na povrchu fága probíhá *in vitro*. Nejprve je cílová molekula imobilizována na pevný povrch a k ní je přidána fágová knihovna. Částice bakteriofágů schopné vázat cílovou molekulu zůstanou připojeny k povrchu, ostatní částice jsou odstraněny. Po eluci následuje infekce buněk *E. coli* navázanými bakteriofágy a vzniká knihovna variant proteinu. Tato knihovna může být použita k dalšímu kolu selekce, nebo k analýze jednotlivých klonů. Fágový displej je tedy prováděn v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Mezi nejčastěji používané fágové částice patří λ fág, T4 a T7 fág, M13 a filamentózní bakteriofág (**Kuzmicheva and Belyavskaya, 2016**).



Obrázek 5 (upraveno) - Schéma afinitní selekce bakteriofágů vázajících se na imobilizované cílové molekuly (Kuzmicheva and Belyavskaya, 2016).

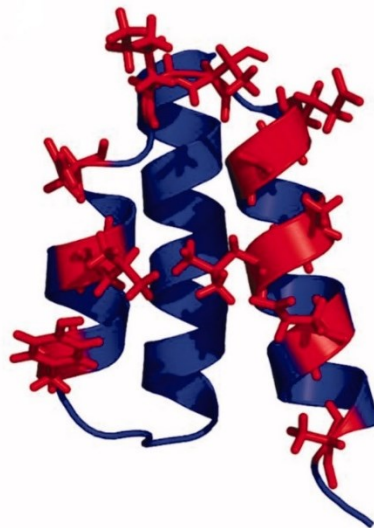
2.6 Bakteriální displej

Bakteriální displej představuje *in vitro* technologii řízené evoluce molekul. Metoda zjednodušuje a urychluje proces selekce malých vazebných proteinů z kombinatoriálních knihoven. Její princip spočívá ve vystavování proteinů na povrchu bakteriální buňky, jako je např. *E. coli*. Randomizované varianty polypeptidu vystavené na povrchu bakteriálních buněk představují knihovnu, která může být použita k selekci konkrétních klonů. Protein musí při cestě z buňky na bakteriální povrch překonat plazmatickou membránu, v případě Gramnegativní bakterie navíc i široký periplasmatický prostor. Vystavovaný protein je exprimován a zakotven v membráně buňky ve formě fúzní molekuly s jiným povrchovým proteinem bakterie a je spojen se svou kódující DNA sekvencí uvnitř buňky. Při selekci variant vazebných proteinů se pozitivní bakteriální klony váží na vybranou cílovou molekulu, zatímco ostatní varianty jsou odstraněny. Navázané klony jsou izolovány a získané DNA sekvence představují knihovnu, která může být opět vložena do buněk *E. coli* a produkované proteiny použity k dalšímu kolu selekce, tentokrát za přísnějších podmínek. Selektce pomocí bakteriálního displeje může probíhat spolu s MACS (z angl. Magnetic-activated cell sorting) a FACS (z angl. Fluorescence-activated cell sorting) metodami zajišťujícími rychlejší a přesnější selekci vazebných a odstranění negativních klonů. Izolované vazebné molekuly vykazují vysokou afinitu k akceptorovým molekulám (Christmann et al., 1999).

3 Albumin vazebná doména (ABD)

3.1 Charakteristika

Albumin vazebná doména (ABD) je malá proteinová doména tvořená strukturou tří levotočivých α -helixů. Je velmi stabilní v širokém spektru pH a teplot (**Johansson et al., 1995**). Spolu s dalšími proteinovými doménami, které se vyznačují specifitami vůči různým sérovým proteinům, se vyskytuje jako součást proteinů na povrchu Grampozitivních bakterií, umožňuje vázat sérový albumin a má význam pro bakteriální patogenezi. Bakteriální druhy nesoucí na svém povrchu albumin vazebnou doménu jsou oportunistickými patogeny a obvykle žijí jako součást přirozené lidské bakteriální flóry. Vazbou sérových proteinů na specifické domény bakteriálního povrchu dochází k maskování bakterie, což jí umožňuje únik před imunitním systémem (**Nilvebrant and Hober, 2013**) urychluje její růst a zvyšuje virulenci (**de Chateau et al., 1996**).



Obrázek 6 (upraveno) Struktura (pdb id 1gjt) ABD scaffoldu. Červené tyčky představují 11 aminokyselinových pozic určených k randomizaci (**Křížová et al., 2017**).

Streptokokový protein G, sérologické skupiny C a G, o molekulové hmotnosti 63 kDa představuje IgG vazebný receptor. Testováním zkráceného rekombinantního proteinu G o hmotnosti 23 kDa bylo zjištěno, že protein G je bifunkčním receptorem, protože kromě vazby IgG umožňuje vázat lidský sérový albumin (HSA). Na základě produkce různých částí receptoru v *E. coli* a následné afinitní chromatografie na Sefaróze bylo zjištěno, že vazebná oblast pro HSA je tvořena 64 aminokyselinovými zbytky a je strukturně odlišná od IgG vazebné části molekuly (**Nygren et al., 1988**).

Některé bakteriální kmeny *Peptostreptococcus magnus* (od roku 1999 známé jako *Finegoldia magna* (**Murdoch and Shah, 1999**)), vyskytující se jako lidské anaerobní komenzálové nebo patogenní organismy, mají na svém povrchu albumin vazebný protein zvaný PAB o délce 387 aminokyselin. Jiné druhy *P. magnus* exprimují na svém povrchu protein L, který váže lehký řetězec imunoglobulinů. Oblast proteinu G se specifitou vůči HSA o délce 135 párů bazí je sekvenčně podobná s HSA vazebnou oblastí PAB. HSA vazebná oblast byla identifikována jako součást povrchových proteinů mnoha bakteriálních druhů. Analýzou genu pro GA modul (albumin vazebná oblast PAB proteinu podobná HSA vazebné oblasti proteinu G) bylo zjištěno, že albumin vazebná doména je původně odvozená od HSA vazebné oblasti proteinu G a je produktem mezidrukové rekombinace, kdy došlo k tomu, že do sekvence peptostreptokokového povrchového proteinu byla vnesena genová sekvence funkční vazebné domény pro albumin skrze konjugační plazmid (**de Chateau and Bjorck, 1994**).

3.2 ABD jako scaffold

3.2.1 Vazebné molekuly proti lidskému interferonu gama (hIFN γ)

ABD doména proteinu G bakterie *Streptococcus* G148 (SpG), neboli GA modul, o délce 46 aminokyselin může být využita v proteinovém inženýrství k modifikacím umožňujícím vazbu jiných ligandů než HSA. Struktura ABD byla podrobena počítačové analýze, na jejímž základě byly *in silico* určeny pozice aminokyselin vhodných pro randomizaci tak, aby při násobných substitucích nedošlo k narušení celkové struktury a stability domény a byla omezena specifita ABD pro HSA. 11 aminokyselinových zbytků bylo určeno k randomizaci a následně byla vytvořena ABD kombinatoriální knihovna o teoretické komplexitě $2 \cdot 10^{14}$ variant proteinů. Jako cílová molekula ABD scaffoldu byl použit lidský interferon gama (hIFN γ), prozánětlivý cytokin. S využitím *in vitro* ribozomálního displeje byly identifikovány pozitivní klony, jejichž vazebné schopnosti byly následně analyzovány pomocí ELISA a dosažené afinity se pohybovaly v rozmezí 0,2 – 10 nM (**Ahmad et al., 2012**). Výhodou uvedeného návrhu kombinatoriální knihovny je rozrušení T a B buněčných epitopů nesených přirozenou ABD doménou (**Krizova et al., 2017**).

3.2.2 Tvorba bispecifických ABD molekul

Randomizací 11 aminokyselinových zbytků ve struktuře ABD byly vytvořeny i nové vazebné proteiny s duálními afinitami, a to tak, že randomizace proběhla na opačné straně molekuly než ve vazebné oblasti pro HSA. S využitím metody řádového displeje byly z vytvořené knihovny

klonů selektovány bispecifické varianty s afinitami vůči HSA a Z₂ doméně A, tzv. ABDz1 vazebné molekuly (**Alm et al., 2010**).

Diverzifikací ve struktuře trojhelikální domény mimo albumin vazebnou oblast byla generována knihovna variant klonů, z níž byly *in vitro* metodou fágového displeje selektovány klony pozitivní vůči nové cílové molekule, tumor nekrotizujícímu faktoru (TNF- α). Tyto jednodoménové vazebné struktury představují velmi malé bispecifické molekuly zachovávající si specifitu vůči HSA. Ovšem varianty schopné vázat TNF- α s nejvyšší detekovanou afinitou vykazovaly sníženou schopnost vázat albumin. Ke zvýšení afinity byla na základě sekvencí získaných selekcí pozitivních klonů vytvořena knihovna druhé generace, z níž byly metodou stafylokokového displeje v kombinaci s průtokovou cytometrií (FACS), umožňující monitorovat více parametrů najednou, izolovány vysoce specifické struktury vážící jak TNF- α , tak albumin s vysokými afinitami (pro TNF- α méně než 5 nM a 40 nM pro HSA). Tato metoda představuje možnost vytvářet bispecifické vazebné struktury s vysokými afinitami vůči mnoha cílovým molekulám, které mimo jiné velmi dobře prostupují tkáněmi a díky vazbě na albumin vynikají *in vivo* dlouhým poločasem života (**Nilvebrant et al., 2011**).

Další z cílových struktur bispecifické ABD molekuly je například receptor pro epidermální růstový faktor 3 (ErbB3) vyskytující se v nádorových tkáních. Bispecifická molekula ABD, vynikající svou vysokou termostabilitou a afinitou k ErbB3 v nanomolární oblasti, má potenciál blokovat vazbu Neuregulínu-1, přirozeného ligandu receptoru, a tudíž bránit proliferaci nádoru (**Nilvebrant et al., 2013**).

3.2.3 Vazebné proteiny cílené na molekuly IL-23R a IL-23

IL-23R neboli receptor pro lidský interleukin 23, prozánětlivý cytokin produkováný dendritickými buňkami, hraje důležitou roli v buněčné signalizaci. Molekula IL-23 sestává z podjednotek p19 a p40, pomocí kterých interaguje s příslušnými receptory na povrchu lymfocytů (p19 interaguje s IL-23R) a spouští signální kaskádu vedoucí k sekreci zánětlivých modulátorů uplatňujících se v řadě autoimunitních onemocnění, jako je psoriáza nebo Crohnova nemoc (**Oppmann et al., 2000**).

Nové vazebné molekuly schopné blokovat interakce mezi IL-23 p19 podjednotkami a jejich receptory představují potenciální prostředky k terapii některých autoimunitních onemocnění.

K selekci specifických vazebných variant z vysoce komplexní ABD kombinatoriální knihovny byl sestaven rekombinantní protein odvozený od extracelulární domény IL-23R, který byl následně produkován a purifikován z *E. coli* a použit k selekci pozitivních variant klonů a ELISA stanovení vazebných schopností izolovaných proteinů. Vybrané vysoce afinní varianty vůči IL-23R byly nazvány REX proteiny. Ke studiu interakcí mezi IL-23 a IL-23R byla vytvořena rekombinantní varianta podjednotky p19. REX proteiny inhibují interakce mezi IL-23R a p19 podjednotkou IL-23 cytokinu a představují slibné receptorové antagonisty schopné regulovat funkce imunitního systému *ex vivo* (Kuchar et al., 2014).

Na základě této studie byly následně produkovány ILP vazebné molekuly odvozené od ABD scaffoldu představující proteiny cílené na α podjednotku (p19) lidského cytokinu IL-23 schopné inhibovat interakce mezi p19 proteinem (IL-23) a IL-23R receptorem a bránit *ex vivo* expanzi primárních lidských T buněk produkujících IL-17. ILP byly selektovány z vysoce komplexní ABD knihovny čítající na 10^{14} klonů, vytvořené randomizací 11 aminokyselin, metodou ribozomálního displeje. Jako cílová molekula byla vytvořena rekombinantní fúzní varianta p19 podjednotky o velikosti 69 kDa, produkována v *E. coli* a purifikována. Izolované ILP vysoce afinní varianty postrádají funkci vázat HSA, kvůli randomizaci určitých aminokyselinových zbytků, ovšem vykazují vysokou specifitu pro IL-23, blokují vazbu p19 na IL-23R a mohou sloužit jako specifické imunomodulátory. Díky svým unikátním vlastnostem, jako je malá velikost a schopnost opětovně se samovolně skládat, mají potenciál vytvářet léčiva prostupující kůži využitelné například k léčbě psoriázy (Krizova et al., 2017).



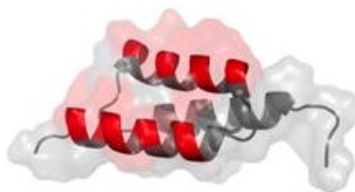
Obrázek 7 (upraveno) Krystalová struktura lidského IL-23 (pdb id 3duh) složená z proteinu p19 (červená, α -podjednotka) vázaného na protein p40 (oranžová, β -podjednotka) (Krizova et al., 2017).

Od ABD domény lze odvodit vysoce specifické vazebné varianty využitelné jako kotvící proteiny pro nové diagnostické nástroje, například mikročipy nebo ELISA soupravy (**Šípová et al., 2012**). Dalším příkladem mohou být PAB proteiny rozpoznávající a vázající PSP94 protein (prostatický sekretorický protein 94), biomarker rakoviny prostaty, které mohou sloužit k diagnostice a detekci karcinomu prostaty u mužů (**Marečková et al., 2015**).

4 Affibody molekuly

4.1 Charakteristika

Receptor nacházející se na bakteriálním povrchu, stafylokokový protein A (SPA), je tvořen repetitivní strukturou složenou z pětkrát se opakující domény o 58 aminokyselinách, která se účastní vazby IgG, a dvanáctkrát se opakující domény o 8 aminokyselinách zodpovědné pravděpodobně za vazbu receptoru k buněčné stěně bakterie *Staphylococcus aureus* (**Uhlen et al., 1984**). B doména tvořená 58 aminokyselinami neobsahuje cysteiny, její struktura tedy není závislá na tvorbě disulfidických můstků a může být při produkci vystavena redukčním podmínkám. Doména je vysoce solubilní, proteolyticky a teplotně stabilní (**Nord et al., 1997**) a patří mezi jedny z nejrychleji se skládajících proteinových struktur (**Arora et al., 2004**). Analogem B domény je Z doména vytvořená mutacemi ke zvýšení chemické stability molekuly (**Nilsson et al., 1987**). Z doména je založena na struktuře tří α -helixů a je schopná tolerovat násobné substituce aminokyselin v oblastech účastnících se vazby ligandu. Kombinatoriální knihovny affibody molekul byly konstruovány na základě randomizace 13 aminokyselinových zbytků lokalizovaných na dvou ze tří α -helixů zodpovědných za vazbu Fc fragmentu protilátek (**Nord et al., 1997**).



Obrázek 8 (upraveno) – Struktura affibody molekuly (PDB: 2B88). Variabilní oblast vyznačena červenou barvou, strukturální oblast vyznačena šedou barvou (**Stern et al., 2013**).

4.2 Chemická syntéza

Jednou z možností vedoucích k produkci troj-helikálních vazebných molekul je využití metody chemické syntézy, při které vznikají fluorescenčně značené Z domény široce využitelné například v imunologii či biochemickém výzkumu. Molekula si zachovává svou vazebnou specifitu a dochází ke správnému sbalení proteinu. Fluorescenčně značenou affibody molekulu lze biotinylovat a následně ji, díky interakci mezi streptavidinem a biotinem, imobilizovat na povrch čipu potaženého streptavidinem bez ztráty aktivity. Výhodou je možnost vytvoření fluorescenčně značené vazebné domény sloužící i jako biosenzor při detekci imunoglobulinů IgG a IgA (**Engfeldt et al., 2005**).

4.3 Optické zobrazovací metody

Affibody molekuly nacházejí využití i při *in vivo* optických zobrazovacích metodách. Tato metoda umožňuje studovat stejně značenou sondu *in vivo* i *in vitro* pomocí mikroskopie a průtokové cytometrie. Příkladem může být NIR fluorescence. Z doména specificky vázající EGFR a fluorogen aktivační protein (FAP) společně tvoří tumor vazebnou sondu affiFAP, která reverzibilně váže a aktivuje fluorescenci jinak nefluorescenčních barviv a umožňuje vizualizaci nádorové tkáně. Výhodou této techniky je vysoký kontrast, rychlé odbourávání vazebné molekuly a dobrá prostupnost tkání (**Wang et al., 2017**).

4.4 Syntéza a využití

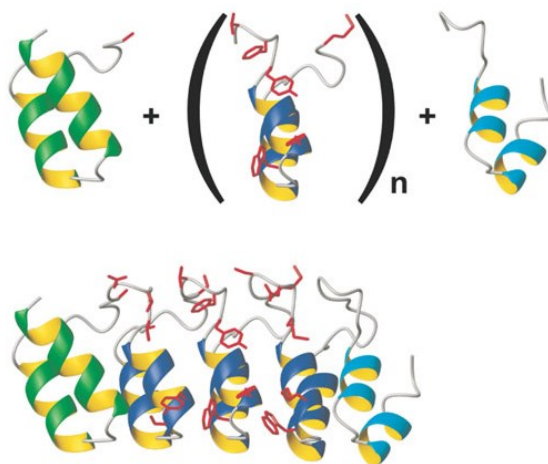
Affibody proteiny, které váží určitou cílovou molekulu, lze získat s využitím různých metod. Jednou z nich je metoda fágového displeje, kterou byly vytvořeny molekuly schopné vázat IgA s vysokou afinitou (**Cao et al., 2012**), nebo CD28 specifické vazebné proteiny (**Sandstrom et al., 2003**). Dále využití ribozomálního displeje vedlo k selekci vazebných molekul pro myší IgG Fab. Afinní molekuly schopné rozpoznávat a vázat protilátky jsou hojně využívány v imunologii při afinitní purifikaci imunoglobulinů a k jejich detekci (**Grimm et al., 2011**). V proteinovém inženýrství se využívá i stafylokokový displej, s jehož pomocí byly získány dimerní A beta specifické vazebné molekuly (**Lindberg et al., 2013**). Mezi další cíle affibody molekul patří například gp120 (**Wikman et al., 2006**) a transferin (**Gronwall et al., 2007**).

Affibody molekuly proti HER2 receptorům slouží k detekci a vizualizaci nádorů s využitím malých radioaktivně značených vazebných proteinů zajišťujících vysoký kontrast zobrazované tkáně (Orlova et al., 2006). Nádorové buňky exprimují na svém povrchu EGFR a HER2 receptory rozpoznávané bispecifickými affibody molekulami, což umožňuje zvýšení vazebné specifity těchto proteinů (Friedman et al., 2009).

5 DARPin molekuly

5.1 Charakteristika

Proteiny složené z repetitivních sekvencí se v přírodě uplatňují v řadě interakcí mezi proteiny a jsou základem mnoha biologických procesů. Jejich stavba založená na opakujících se homogních strukturních podjednotkách (tzv. modulární struktura) tvořících proteinovou doménu umožňuje adaptaci jejich velikosti, zvyšuje variabilitu, nejen na základě bodových mutací, ale i inzerací či delecí opakujících se podjednotek. Struktura repetitivních proteinů může být upravována k zajištění specifických funkcí, aniž by došlo k narušení celkové topologie molekuly. Mezi proteiny s modulární strukturou patří tzv. AR proteiny, jejichž stavba je založená na opakujícím se ankyrinovém motivu (Binz et al., 2004). AR repetitivní proteiny se vyskytují napříč všemi kmeny (Bork, 1993), sestávají z podjednotek o 33 aminokyselinách, které tvoří β -otočku, po níž následují dva antiparalelní α -helixy a smyčka navazující na β -otočku následující podjednotky. Vazebný povrch AR proteinů se nachází v oblasti β -otočky a prvního α -helixu (Binz et al., 2004).



Obrázek 9 (upraveno) – Nahoře: Struktura DARPin molekul je tvořena N-terminální AR (zelená), různým počtem ankyrinových opakování uprostřed (tmavě modrá) a připojením C-terminální AR (světle modrá). Randomizovatelné postranní řetězce jsou znázorněny červeně. Znáznornění tvorby DARPin knihovny na úrovni proteinů je pouze schématické, vytváření knihovny probíhá ve skutečnosti na úrovni DNA. Dole: Příklad struktury DARPin molekuly skládající se ze tří AR modulů. Konkrétně se jedná o MBP vazebný protein zvaný off7 (Binz et al., 2004).

5.2 DARPiny jako scaffold

AR molekuly představují ideální scaffold pro tvorbu alternativních vazebných proteinů díky své variabilní struktuře. S použitím různého počtu podjednotek a randomizací 6 aminokyselin ve vazebné oblasti molekuly (oblast β -ohybu a prvního α -helixu) a 27 aminokyselin ve struktuře proteinu mimo interakční oblast byly generovány kombinatoriální knihovny klonů zvané N2C a N3C (o dvou a třech opakováních) o teoretické komplexitě 10^{10} individuálních klonů různých velikostí. Klony se vyznačovaly snadnou produkcí ve velkém množství v *Escherichia coli* jako solubilní a termodynamicky stabilní proteiny postrádající cysteiny. S využitím selekční metody byly izolovány specifické varianty vůči cílovým molekulám MBP (vazebnému proteinu pro maltózu) a dvěma MAPK (eukaryotickým mitogenem aktivovaným protein kinázám). Vazebné proteiny cílené na molekuly MBP a MAPK (JNK2 vazebné molekuly a p38 vazebné molekuly) byly selektovány z obou knihoven pomocí ribozomálního displeje a purifikované pozitivní varianty byly analyzovány pomocí ELISA s naměřenými afinitami v nanomolárních oblastech. Krystalová struktura komplexu cílové a vazebné molekuly potvrdila, že interakční povrch se nachází v místech randomizovaných aminokyselin. Získané AR proteiny jsou stabilními strukturami tvořenými velkým množstvím potenciálních interakčních povrchů využitelné v terapeutických aplikacích jako alternativa k rekombinantním protilátkám (Binz et al., 2004).

5.3 Využití

5.3.1 DARPiny vázající molekuly VEGF-A

Z kombinatoriální knihovny klonů DARPin molekul byly metodou ribozomálního displeje selektovány pozitivní varianty vůči VEGF-A. Vazebná schopnost jednotlivých izolovaných klonů byla následně testována pomocí ELISA a varianty se silným ELISA signálem byly produkovány v *E. coli*, purifikovány a opět analyzovány pomocí ELISA. Selektované varianty vykazovaly afinity vůči VEGF-A121 a VEGF-A165, ale postrádaly schopnost vázat VEGF-C. DARPiny proti VEGF-A, vážící svou cílovou molekulu s afinitami v pikomolárních oblastech, blokují vazbu VEGF-A na receptor VEGFR-2 a potlačují neovaskularizaci rohovky *in vitro* a *in vivo*. DARPiny představují proteinový scaffold potenciálně využitelný k vývoji nových léčiv inhibujících angiogenezi spojenou s očním onemocněním. MP0112/AGN-150998, DARPin inhibující VEGF-A, je zkoumán v klinických testech jako potenciální prostředek k léčbě věkem podmíněné makulární degenerace (AMD) a diabetického makulárního edému (DME) (Stahl et al., 2013).

5.3.2 DARPiny blokující HGF a VEGF

VEGF a HGF faktory se vazbou na své receptory uplatňují v buněčných signalizacích spojených s růstem nádorů, angiogenezí, invazivitou nádorových buněk a tvorbou metastáz. MP0250 představuje trispecifický DARPin, který váže a inhibuje aktivitu vaskulárního endoteliálního faktoru (VEGF) a růstového faktoru hepatocytů (HGF) a zároveň váže lidský sérový albumin (HSA), který zvyšuje poločas života molekuly a má potenciál zvyšovat prostupnost molekuly nádorovou tkání. MP0250 je nyní ve fázi I klinického testování (**Rodon et al., 2015**).

5.3.3 DARPiny s aktivitou proti HER receptoru

In vitro selekcí DARPin vazebných variant se specifitami vůči receptoru 2 pro epidermální růstový faktor (HER2) byly metodou ribozomálního displeje z kombinatoriálních knihoven DARPin molekul (N2C a N3C knihoven) izolovány pozitivní klony vázající se na extracelulární doménu HER2 *in vitro* v nádorových buňkách a *in situ* v tkáních karcinomu prsu. Analýzou pomocí FACS bylo zjištěno, že zkoumané pozitivní klony jsou navíc schopny vázat HER2 extracelulární doménu *in vivo*. Selektované varianty jsou vysoce afinní, stabilní a specifické vůči HER2 a mohou být snadno produkovány v *E. coli*. Díky svým vlastnostem jsou vhodné jako nástroje k diagnostickým aplikacím *in vivo* a *in vitro*, například ve formě fúzních proteinů, a mají terapeutický potenciál (**Zahnd et al., 2006**).

Další z variant DARPin molekul (MP0274) váže receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor (HER2), onkogen, jehož nadprodukce vede k transformaci buněk a nádorovému bujení (**Hudziak et al., 1987**). MP0274 inhibuje buněčnou signalizaci receptorů HER2 a HER3, blokuje HER2 homodimerizaci a HER3 heterodimerizaci, indukuje HER2 internalizaci do buňky a navozuje potlačení nádorové tkáně. Vazba na lidský sérový albumin umožňuje prodloužení poločasu života proteinu. Molekula představující potenciální léčebnou alternativu u nádorových buněk exprimujících HER2 se nyní nachází ve fázi preklinického vývoje (**MOLECULAR PARTNERS**).

6 Anticaliny (Affiliny)

6.1 Charakteristika

Anticaliny neboli Affiliny představují proteinové fragmenty odvozené od struktury lipokalinů. Lipokaliny jsou malé kompaktní monomerní proteiny, tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem (Beste et al., 1999), vyskytující se v mnoha organismech, jejichž funkce spočívá v ukládání a transportu fyziologicky důležitých biomolekulárních struktur, jako jsou vitamíny, hormony a sekundární metabolity (Vogt and Skerra, 2004). Jsou tvořeny β -barelem z osmi antiparalelních β -listů. Na jednom z konců β -barelu se nacházejí čtyři smyčky, které vytvářejí vstup do vazebné kapsy pro ligand. Tyto čtyři smyčky se značně liší konformacemi a velikostmi mezi jednotlivými lipokaliny, což jim umožňuje vázat široké spektrum ligandů (Beste et al., 1999).

6.2 Selektce BBP vazebných variant

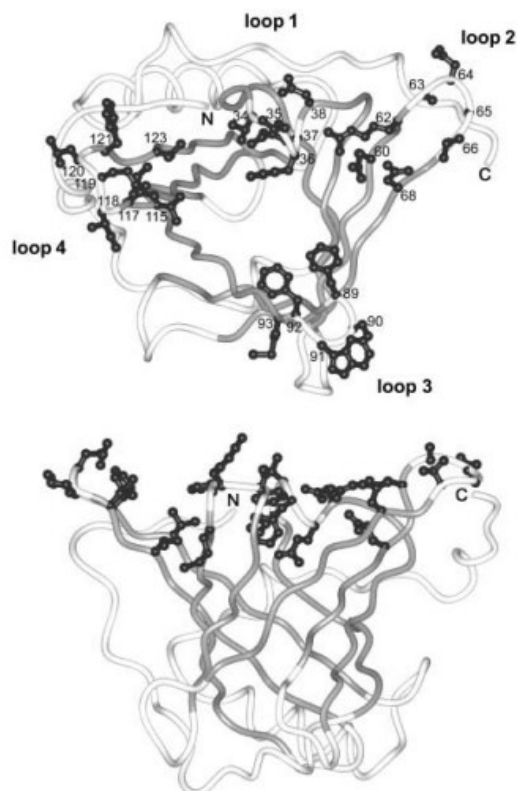
Vazebná oblast lipokalinu z *Pieris brassicae*, bilin vazebného proteinu (BBP), byla náhodně mutována s využitím PCR. Pozice 16 aminokyselin určených k randomizaci byly vybrány tak, aby byly schopny tolerovat malé i velké substituce na postranním řetězci a na jejich základě byla generována kombinatoriální knihovna. Pomocí bakteriálního fágového displeje byly selektovány BBP vazebné varianty s nanomolárními afinitami k prvnímu modelovému haptenu fluoresceinu, který představuje chemicky odlišnou strukturu od BBP přirozeného ligandu biliverdinu IX_γ. Tyto malé receptorové proteiny schopné vázat odlišné hapteny s vysokou afinitou byly nazvány Anticaliny. Následně byly vytvořeny Anticaliny se specifitami pro další ligandy (Beste et al., 1999).

6.3 Selektce hemoglobin vazebných molekul

Lidské lipokaliny představují vhodné struktury pro selekci vazebných molekul využitelných k terapeutickým aplikacím, protože autologní proteiny mají nízkou imunogenicitu, tedy schopnost vyvolat humorální nebo buněčnou imunitní odpověď.

Lidský apolipoprotein D (ApoD) váže široké spektrum malých ligandů v závislosti na tom, z jaké tkáně pochází. Slouží například k transportu arachidonové kyseliny a progesteronu (které váže s mikromolárními afinitami) v tělních tekutinách. ApoD byl vybrán jako struktura vhodná pro tvorbu kombinatoriálních knihoven a selekci umělých vazebných proteinů Anticalinů.

Randomizací 24 aminokyselin lokalizovaných v oblasti variabilních smyček byly s využitím fágového displeje a skríninku kolonií izolovány varianty ApoD s afinitami k hemoglobinu, který představuje biochemicky dobře prostudovanou modelovou cílovou molekulu. V případě bilin vazebného proteinu byly generovány molekuly s afinitami vůči haptenům, tedy látkám o nízké molekulové hmotnosti. Selektované vazebné molekuly proti hemoglobinu tedy představují první lipokaliny schopné rozpoznávat proteinovou strukturu (Vogt and Skerra, 2004).



Obrázek 10 – 3D struktura apolipoproteinů D s vyznačenými randomizovatelnými pozicemi. Nahoře: Znárodnění kapsy pro ligand. Dole: Pohled z boku. Struktura tvořící β -barel znázorněna šedě. 4 smyčky obsahují 24 randomizovatelných aminokyselinových zbytků znázorněných černě a označených číslem (Vogt and Skerra, 2004).

Anticaliny mohou být produkovány v *Escherichia coli* jako vysoce stabilní molekuly. Fúzí s enzymy, jako je například alkalická fosfatáza, mohou být vytvořeny fúzní proteiny využitelné k diagnostickým aplikacím. Spojením dvou Anticalinů, které rozpoznávají odlišné ligandy vznikají bispecifické vazebné molekuly zvané Duocaliny (Schlehuber and Skerra, 2001).

6.4 Využití

6.4.1 Anticaliny cílené proti ED-B doméně onkofetálního fibronektinu

Alternativní vazebné molekuly jsou využívány k diagnostickým účelům v histologických a zobrazovacích metodách. Anticaliny N7A, N7E a N9B jsou charakteristické vysokou specifitou a afinitou vůči ED-B doméně onkofetálního fibronektinu. Rozpoznávají a váží tuto strukturu ve tkáni primárního glioblastomu, v perivaskulárních oblastech bohatých na fibronektin, které souvisejí s angiogenezí. S využitím cytofluorometrie bylo zjištěno, že Anticaliny váží ED-B nejen ve fixovaných vzorcích tkáně, ale i v živých buňkách. Vazbou γ -emitter¹²³I byla pomocí *in vitro* autoradiografie potvrzena specifická vazba ED-B vazebných Anticalinů k vzorkům tkáně glioblastomu. Anticaliny nacházejí využití v zobrazovacích metodách k detekci primárního glioblastomu a přilehlých oblastí, kde dochází k angiogenezi (**Albrecht et al., 2016**).

6.4.2 Selektce Anticalinů s afinitami vůči PMSA (prostatický specifický membránový antigen)

Dalšími ze selektovaných Anticalinů jsou molekuly schopné vázat lidský PMSA antigen využitelné v biomedicínských aplikacích a *in vivo* zobrazovacích metodách. PMSA může sloužit jako cílová molekula k detekci karcinomu prostaty, případně i k detekci zhoubných nádorů obecně. Z kombinatoriální knihovny založené na struktuře lidského lipokalinu 2 (Lcn 2) byly s využitím fágového displeje a ELISA selektovány PMSA specifické varianty a následně produkovány v *Escherichia coli* jako rozpustné proteiny. Ke zlepšení vazebných schopností těchto molekul přispěla afinitní maturace, po které následovala selektce pomocí fágového displeje a bakteriálního displeje za přísnějších podmínek. Vznikly tak struktury, které váží své cíle s pikomolárními afinitami. Imunofluorescenční mikroskopie umožnila pozorovat specificky zabarvené PMSA pozitivní nádorové buněčné linie a průtoková cytometrie potvrdila schopnost Anticalinů detekovat PMSA v živých buňkách (**Barinka et al., 2016**).

Dále byly izolovány například vysokoafinní Anticaliny specifické pro Amyloid beta (A β) peptid, jehož nadprodukce vede k ukládání v mozku, a který představuje biomolekulární cíl pro léčbu Alzheimerovy choroby (**Rauth et al., 2016**). Anticaliny se specifitami vůči receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor 3 (VEGFR-3) s afinitami v pikomolární oblasti představují slibné struktury pro *in vivo* zobrazování a detekci a terapii nádorové tkáně. VEGF receptory se uplatňují při angiogenezi a lymfangiogenezi a jsou důležité pro růst nádoru a

tvorbu metastáz (**Richter and Skerra, 2017**). Vazebné molekuly Anticaliny nacházejí dále využití v radioimunologických terapeutických metodách a *in vivo* zobrazování (**Eggenstein et al., 2014**).

6.5 Anticaliny v klinických testech

PRS-050 (Angiocal) je nový uměle vytvořený vazebný protein odvozený od struktury Anticalinu založeném na lipokalinu nacházeném v lidských slzách. PRS-050 byl selektován metodou fágového displeje proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru A (VEGF-A), který spolu se svým receptorem (VEGFR) hraje důležitou roli v buněčné signalizaci u běžné, ale i patologické angiogeneze podporující výživu a rozrůstání nádorové tkáně. PEGylovaný PRS-050 Anticalin, potenciální terapeutikum u pacientů se zhoubnými nádory, váže VEGF-A s vysokou afinitou a ve fázi I klinických testů byl dobře tolerován (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01141257) (**Mross et al., 2013**).

PRS-080 je Anticalin vazebný protein cílený na molekulu hepcidinu, negativní regulátor metabolismu železa. PRS-080 odstraňuje hepcidin a umožňuje mobilizaci železa uloženého v buňkách. Protein nacházející se ve fázi I klinických testů má potenciální využití jako terapeutikum pro pacienty trpící anémií (**Pharmaceuticals, 2015**).

7 Adnectiny

7.1 Charakteristika

Desátá doména fibronektinu typu 3 (neboli ¹⁰FN3) je malá monomerní doména o 94 aminokyselinových zbytcích, vyskytující se v mnoha zvířecích proteinech účastnících se vazby ligandu. Je tvořena β-sendvičem (**Main et al., 1992**), strukturně se podobá variabilním doménám protilátek. Na každém z konců polypeptidového řetězce domény se nacházejí tři smyčky zvané BC, DE a FG, jejichž pozice odpovídají pozicím smyček na VH doméně CDR1, CDR2 a CDR3 zodpovědné za specifickou vazbu imunoglobulinů ke svým cílovým molekulám. BC, DE a FG jsou variabilní v rámci FN3 domén, což jim umožňuje tolerovat uměle navozené změny v jejich sekvenci, aniž by došlo k velkému narušení struktury a stability molekul (**Parker et al., 2005**). V přírodě se vyskytující ¹⁰FN3 je velmi stabilní, neobsahuje žádné cysteiny, tudíž žádné disulfidické můstky a může být produkována v *Escherichia coli*.

Přítomnost FN3 domén v lidském séru je výhodou pro tvorbu proteinových léčiv, protože selektované varianty mají potenciál být málo imunogenní (**Koide et al., 1998**).

Randomizací CDR podobných smyček lidské ¹⁰FN3 domény byly vytvořeny kombinatoriální knihovny a selekcí pomocí například fágového displeje (**Koide et al., 1998**), mRNA displeje (**Mamluk et al., 2010**) nebo kvasinkového dvouhybridového displeje (**Koide et al., 2002**) byly izolovány vazebné molekuly s afinitami vůči konkrétním cílům.

7.2 Izolace FN3 mutantů vážících nové ligandy

Jako jedny z prvních byly selektovány varianty struktur vážících ubiquitin, malý protein účastnící se degradační dráhy u eukaryot. V přírodě se vyskytující FN3 přitom nemají žádnou afinitu vůči ubiquitinu. Na základě aminokyselinové struktury byl konstruován gen pro ¹⁰FN3. Randomizací celkem 10 aminokyselinových zbytků v BC a FG smyčkách a delecí 3 zbytků na FG smyčce byla vytvořena kombinatoriální knihovna zahrnující 10⁸ klonů. Pomocí fágového displeje byly selektovány vazebné varianty, míra afinity byla charakterizována s použitím fágové ELISA techniky. Následně byly vazebné proteiny exprimovány v *Escherichia coli* a purifikovány. Izolované varianty nevykazovaly vysokou specifitu a afinitu vůči cílové molekule, ovšem podařilo se na FN3 strukturu aplikovat velké množství mutací, aniž by došlo k závažnému narušení stability a struktury domény, a byly úspěšně selektovány FN3 mutanty s novými vazebnými funkcemi (**Koide et al., 1998**).

7.3 Adnectiny jako vazebné molekuly

7.3.1 Adnectiny cílené na molekuly myostatínu

Myostatin (GDF-8) je protein fungující jako negativní regulátor růstu a diferenciaci buněk kosterního svalstva. Byly selektovány vazebné molekuly s vysokými afinitami vůči myostatínu a GDF-11, konkrétně lidský BMS-986089. K prodloužení poločasu života BMS-986089 byla využita fúze s Fc fragmentem protilátek. Tyto vazebné molekuly fungují jako inhibitory svých cílových molekul a brání jejich buněčné signalizaci, což vede ke zvětšování objemu svalové hmoty a zvyšování tělesné váhy. Adnectiny cílené na molekuly myostatínu jsou využívány k vývoji terapeutik pro léčbu onemocnění projevujících se svalovou atrofií, jako je Duchennova muskulární dystrofie (**Jacobsen et al., 2016**). BMS-986089 se nyní nachází ve fázi klinického testování. (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02515669).

7.3.2 Inhibitor VEGFR-2

VEGFR-2 je receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF, jejichž společná vazba spouští signální kaskádu regulující vaskulogenezi, angiogenezi a lymfangiogenezi (**Schiff et al., 2015**).

CT-322 představuje novou vazebnou molekulu vytvořenou na základě struktury Adnectinu, které má funkci jako inhibitor receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor VEGFR-2. Specifické vazebné varianty Adnectinu byly izolovány z kombinatoriální knihovny pomocí mRNA displeje a vykazovaly vysokou afinitu vůči cílové molekule VEGFR-2 (K_D 11 nM), zároveň nebyly schopny vázat další z receptorů VEGFR-1 a VEGFR-3 do koncentrace až 100 nM. K prodloužení poločasu života pozitivních klonů byla využita metoda PEGylace, vazba polyethylenglykolu. CT-322 blokuje fosforylaci VEGFR-2 a MAP kinázy způsobenou vazbou VEGF v endoteliálních buňkách lidské pupeční žíly (HUVECs). CT-322 umožnil inhibici růstu nádorů ve vzorcích tkáně glioblastomu a karcinomu tlustého střeva (**Mamluk et al., 2010**). I přestože molekula vykazovala tolerovatelné vedlejší účinky a značnou biologickou aktivitu, terapeutický účinek CT-322 se ve fázi II klinického testování ukázal být málo efektivní (**Schiff et al., 2015**).

7.3.3 Další příklady cílových molekul Adnectinů

Dalším z významných molekulárních cílů v onkologii je receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), který se díky vazbě epidermálního růstového faktoru (EGF) na extracelulární část receptoru a následné fosforylaci účastní regulace buněčných procesů, které mohou podporovat růst, proliferaci, invazi nádorových buněk a tvorbu metastáz. Selektce vysoce specifických a afinních variant Adnectinů vůči extracelulární oblasti EGFR umožňuje inhibovat aktivitu receptoru, bránit tak buněčné signalizaci a regulovat růst nádorové tkáně (**Iacob et al., 2014**).

Varianty Adnectinů schopné vázat proprotein konvertázu subtilisin/kexin typu 9 (PCSK9), jejíž inhibice vede ke snižování LDL cholesterolu v plazmě, jsou významnými vazebnými molekulami. PCSK9 se podílí na degradaci LDL receptoru a její inhibitory představují slibné prostředky pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění. Vazebná varianta Adnectinu BMS-962476 představuje polypeptid o velikosti 11 kDa, PEGylovaný ke zlepšení jeho farmakokinetických vlastností. BMS-962476, potenciální inhibitor PCSK9, snižuje hladinu LDL a řídí metabolismus cholesterolu v játrech (**Mitchell et al., 2014**). BMS-962476 byl

testován pro své inhibiční účinky ve fázi I klinického testování (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01587365).

8 Fynomery

8.1 Design lidské Fyn SH3 fágové knihovny a selekce ED-B vazebných proteinů

Fyn SH3 (Src homologická oblast 3) doména patřící mezi Src tyrosin kinázy je velká 59 kDa a její aminokyselinová sekvence je stejná u lidí, myší, krys a opic (gibbonů). Je tvořena dvěma antiparalelními β -listy se dvěma smyčkami RT a n-Src, které umožňují zprostředkovávat interakce s dalšími proteiny. Fyn SH3 doména představuje ideální scaffold pro izolaci nových vazebných struktur z toho důvodu, že ji lze exprimovat v bakteriích jako rozpustný protein, je monomerní, stabilní, neobsahuje žádné cysteiny, tudíž netvoří disulfidické můstky. Další výhodou je, že jak původní Fyn SH3, tak nově izolované mutantní klony nevyvolávají imunitní reakci, tedy nejsou imunogenní. Imunogenita je přísně kontrolována u všech scaffoldů potenciálně využitelných k terapeutickým účelům.

První neimunoglobulinové vazebné proteiny (zvané D3 proteiny) odvozené od Fyn SH3 domény byly cíleny na ED-B doménu fibronektinu, která představuje přirozeně se vyskytující marker pro angiogenezi a vyskytuje se výhradně ve tkáni zhoubných nádorů člověka (**Birchler et al., 2003**). PCR randomizací aminokyselinových pozic na RT a n-Src smyčkách byla vytvořena kombinatoriální knihovna, která čítala $1,2 \cdot 10^9$ Fyn SH3 mutantních klonů. Kvalita vytvořené knihovny, která závisí nejen na biofyzikálních vlastnostech vybraného proteinového scaffoldu, ale i na velikosti dané knihovny, byla testována pomocí PCR skříninku kolonií a DNA sekvenace. K selekci pozitivních klonů byl proveden fágový displej. Izolované D3 klony byly exprimovány jako monomery a homodimery vzniklé genetickou fúzí a následně purifikovány. Biotinylovaná doména ED-B byla zachycena na avidin, nebo na streptavidin na povrchu Maxisorp destičky, a byly k ní přidány D3 dimery sestavené ze dvou fragmentů pomocí PCR. K detekci vazby D3 proteinů k ED-B doméně byla využita metoda měření aktivity HRP peroxidázy vázané na protilátku. Analýzou vazebných vlastností získaných proteinů byla naměřena disociační konstanta (K_D) pro monomerní D3 $8,5 \cdot 10^{-8}$ a pro dimerní D3 $4,5 \cdot 10^{-9}$ varianty. Zatímco Fyn SH3 se v nádorových tkáních neakumuluje, D3 dimery se váží na antigen ED-B a byly detekovány *in vivo* v nádorech u myší (**Grabulovski et al., 2007**).

8.2 Fynomery a cílové molekuly

Vazebné proteiny Fynomery odvozené od Fyn SH3 domény fibronektinu byly dále využity ke generování nových vazebných struktur vůči různým cílovým molekulám. Jednou z nich je lidská chymáza, produkovaná mastocyty, hrající roli při alergických reakcích. Selektované Fynomery se váží do jejího aktivního místa a navozují inhibici enzymu, usnadňují krystalizaci a determinaci struktury molekuly (**Schlatter et al., 2012**).

Další z cílových molekul Fynomerů je HER2 receptor, vyskytující se především v rakovinných buňkách u pacientů s karcinomem prsu, proti kterému byly vytvořeny bispecifické HER2 FynomAb fúzní proteiny vzniklé spojením protilátky pertuzumab a 7 kDa velkého Fynomeru C12 cíleného na epitop nacházející se na doméně I proteinu HER2. Nejprve byly vytvořeny čtyři FynomAbs připojením Fynomeru C12 na každý ze čtyř konců protilátky. Tyto FynomAbs proteiny byly nazvány COVA201, COVA202, COVA207 a COVA208. Molekula COVA208 vzniklá připojením Fynomeru C12 na N-konec lehkého řetězce protilátky vykazovala nejvyšší účinnost. COVA208 má schopnost rychlé internalizace HER2 receptoru do buňky a spuštění apoptózy *in vitro*. Redukcí hladiny HER2, HER3 a EGFR v buňkách zároveň umožňuje inhibici signální kaskády spojené s HER2 receptorem *in vitro* a *in vivo* s vyšším účinkem než samotné protilátky pertuzumab nebo trastuzumab (**Brack et al., 2014**).

Fúzí s Fc fragmentem protilátek byly vytvořeny bivalentní Fynomery, konkrétně 2C1-Fc varianty, schopné s vysokou afinitou vázat a inhibovat homodimerní interleukin IL-17A *in vitro* a *in vivo*. Tento cytokin představuje významný prozánětlivý faktor u autoimunitních onemocnění, jako je například revmatoidní artritida a psoriáza. K selekci klonů z Fyn SH3 kombinatoriální knihovny byl použit fágový displej a po něm následovala afinitní maturace získaných variant, vedoucí ke zlepšení jejich vazebných schopností. Fúze s Fc fragmentem napomohla ke zvýšení afinity a zlepšení inhibičních vlastností v důsledku vysoké avidity vazebné molekuly k ligandu. Spojení Fc s SH3 doménou pomocí delších linkerů (10-15 AMK) vedlo k vyšší aktivitě fúzního proteinu díky zvýšené flexibilitě vazebné molekuly, která umožnila lépe vázat oba řetězce homodimerního ligandu IL-17A, než tomu bylo u linkerů kratších. Získané vazebné proteiny představují slibné molekuly k léčbě autoimunitních zánětlivých onemocnění (**Silacci et al., 2014**).

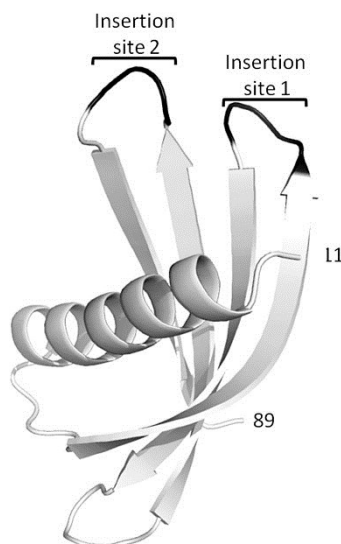
Na základě studie publikované v roce 2014 byla molekula Fynomeru vázající IL-17A geneticky spojena s lehkým řetězcem lidské protilátky adalimumab proti TNF za vzniku bispecifické molekuly zvané TNF/IL-17A FynomAb COVA322. Molekula Fynomeru 11L5B06 byla nejprve pomocí fágového displeje selektována z kombinatoriální knihovny klonů proti rekombinantnímu cíli IL-17A, produkována v *E.coli* a úspěšně testována pro svou schopnost inhibovat IL-17A. Následně byla vytvořena COVA322 vpravením DNA do buněk vaječníků čínské křečka (buňky CHO) a purifikována jako monomerní FynomAb. Analýzou na BIAcore čipu byly testovány vazebné afinity COVA322 vůči IL-17A a TNF pocházejících z člověka a *Macaca fascicularis*. Molekula COVA322 vykazovala schopnost vázat oba cíle zároveň a zjištěné afinity se pohybovaly v pikomolárních oblastech. Navíc bylo zjištěno, že genetickou fúzí molekuly Fynomeru a protilátky adalimumad nebyla pozměněna schopnost protilátky vázat TNF. Léčba umožněná molekulami inhibujícími TNF a IL-17 zároveň by mohla být potenciálně více účinná než inhibice každé molekuly zvlášť. Hlavním rizikem spojeným s inhibicí dvou cytokinů je příliš vysoká imunosuprese, která může způsobit mimo jiné riziko infekce. Dále je také důležité, aby nedocházelo *in vivo* k odštěpení Fynomeru od protilátky, a tudíž k degradaci molekuly. Bylo potvrzeno, že COVA322 zůstává plně funkční *in vivo* v *Macaca fascicularis* po 10 dní. Bispecifická FynomAb COVA322, která může být potenciálně využitelná k léčbě zánětlivých onemocnění, byla podrobena klinickým testům pro pacienty trpící psoriázou (Silacci et al., 2016). Klinická studie byla ukončena (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02243787).

9 Nové scaffoldy

9.1 Adhiron

Nové uměle vytvořené vazebné proteiny zvané Adhirony jsou založeny na struktuře rostlinného fytocystatinu. Fytocystatin je malý protein složený ze 100 aminokyselin patřící mezi inhibitory cystein proteáz. Je monomerní, vysoce rozpustný, termostabilní, není glykosylován a neobsahuje disulfidické můstky. Může být exprimován v *Escherichia coli* ve velkém množství. Inzercí dvou variabilních peptidických oblastí a randomizací 9 aminokyselinových zbytků ve struktuře fytocystatinu byla vytvořena kombinatoriální knihovna obsahující $1,3 \cdot 10^{10}$ klonů. Jako první cílová struktura pro testování účinnosti knihovny byla použita SUMO molekula. Byly úspěšně izolovány vysoce specifické Adhirony s nanomolárními afinitami vůči SUMO. Následně byly izolovány vazebné proteiny proti více než 100 cílům, například proti

fibroblastovému růstovému faktoru (FGF1), nebo SH2 doméně Grb 2. Adhiron molekuly jsou nyní dále zkoumány a je zjišťováno jejich potenciální využití jako vazebných molekul pro cílení různých ligandů, k diagnostice, v zobrazovacích metodách a k tvorbě léčebných a terapeutických prostředků (Tiede et al., 2014).



Obrázek 11 – Krystalová struktura Adhiron92 scaffoldu (PDB ID no. 4N6T) v rozlišení 7.75 Å představuje α -helix a čtyři antiparalelní β -listy (bílá) a inzerční oblasti určené ke tvorbě knihovny (černá) (Tiede et al., 2014).

9.2 Alphabody

Alphabody polypeptidy jsou *de novo* vytvořené struktury sestávající z jednoho řetězce složeného do tří α -helixů v antiparalelní „coil coil“ struktuře, představující úplně nový fold. Jedná se o malé kompaktní proteiny, vysoce stabilní, snadno modifikovatelné, udržující si svou strukturu i při použití násobných substitucí. Obsahují až 25 variabilních aminokyselinových pozic, které mohou být randomizovány za účelem získání specifických vazebných molekul. Alphabody scaffold je využitelný ve vývoji léčebných přípravků, v analytickém výzkumu, diagnostice a v purifikačních technologiích (Desmet et al., 2010).

Alphabody scaffold o molekulové hmotnosti 10 kDa byl vytvořen především k terapeutickým účelům. Jedna z cílových molekul Alphabody je lidský interleukin IL-23, prozánětlivý cytokin, vyskytující se například u pacientů trpících psoriázou. Randomizací různých aminokyselinových pozic ve struktuře Alphabody byly vytvořeny tři kombinatoriální knihovny obsahující od $1,0 - 1,7 \cdot 10^8$ samostatných klonů, k selekci pozitivních klonů byl následně použit fágový displej. Jeden z klonů zvaný C159 (neboli klon 59) byl purifikován jako specifický rozpustný protein v *E. coli* s nanomolární afinitou vůči IL-23 a na základě jeho

sekvence byla vytvořena knihovna „matLib“ určená k afinitní maturaci klonů, která dala vzniknout vysoce afinním vazebným molekulám se subnanomolárními afinitami vůči IL-23. Alfabody varianty potlačují *in vitro* a *in vivo* zánětlivé reakce závislé na IL-23, jako jsou revmatoidní artritida nebo Crohnova nemoc. Alfabody scaffold má potenciál vázat velmi široké spektrum ligandů, vazebné schopnosti specifických klonů mohou být vylepšeny afinitní maturací, může být zvýšena jejich rozpustnost, biospecifita, či mohou být PEGylovány vazbou polyethylenglykolu umožňující pomalejší eliminaci proteinu a snižující schopnost vyvolávat antigenní odpověď **(Desmet et al., 2014)**.

9.3 Centyriny

Vazebné proteiny Centyriny jsou založeny na struktuře Tenascin FN3 domény, Tencon. Kombinatoriální knihovna zvaná TCL14 byla vytvořena randomizací 13 aminokyselinových pozic v sekvenci FN3 domény. K rozšíření generované knihovny FN3 byly k randomizaci využity i oblasti mimo CDR podobné smyčky. Bylo zjištěno, že některé interakce mezi proteiny a doménou nejsou zprostředkovány aminokyselinovými zbytky ve smyčkách, ale na vlákně β -listu. FN3 doména může být tedy randomizovaná i v oblasti vlákna β -listu. Násobné mutace byly pomocí PCR reakce provedeny na C vlákně, CD smyčce, F vlákně a FC smyčce, aniž by došlo k narušení konformační stability. Vysoce afinní Centyriny byly selektovány pomocí CIS displeje. Mezi cílové molekuly patří například c-MET, myší IL-17A a krysí TNF- α , vůči kterým byly izolovány specifické varianty s vysokými afinitami až v pikomolárních oblastech. K určení specifity selektovaných klonů byla provedena ELISA a k dosažení vyšší afinity selektovaných variant byla použita metoda afinitní maturace. Centyriny vykazují značnou biologickou aktivitu, jsou stabilní, mohou být produkovány v bakteriích a jejich biofyzikální vlastnosti z nich dělají struktury vhodné k tvorbě vysoce afinních vazebných molekul **(Diem et al., 2014)**.

9.4 Repebody

Repebody patří mezi neimunoglobulinové struktury s unikátními biofyzikálními vlastnostmi. Jsou založeny na variabilních receptorech lymfocytů (VLR) sestávajících z repetitivních modulů bohatých na leucin (LRR) u bezčelistnatých obratlovců, které představují jedny z nejčastěji se vyskytujících proteinových strukturálních motivů v přírodě. Spojením repetitivních modulů (LRR) mezi N a C koncovými motivy VLR byl sestaven proteinový scaffold, jehož N terminální doména byla přetvořena podle struktury internalinu B na základě

počítačové analýzy podobnosti mezi jednotlivými repetitivními jednotkami. Repebody mají modulární strukturu, široký vazebný povrch, mohou být produkovány v bakteriích ve velkém množství jako solubilní proteiny, jsou vysoce teplotně a pH stabilní a snadno modifikovatelné. Modifikace N terminální domény podle internalinu B umožnila expresi Repebody v *E. coli* a usnadnila úpravy struktury molekuly a produkci vazebných molekul využitelných v biotechnologických a biomedicínských aplikacích. Repebody scaffold může být produkován v různých variantách lišících se počtem LRR modulů, což umožňuje jednoduše vytvářet vazebné povrchy pro různé cílové molekuly přidáním nebo odebráním LRR, bez narušení celkové stability molekuly. Z vytvořené kombinatoriální knihovny byly pomocí fágového displeje izolovány vysoce specifické vazebné varianty proti různým cílům, například MD2 (lymfocytární antigen 96) nebo IL-6 s afinitami v nanomolárních oblastech. Repebody představuje díky své modulární struktuře vhodný scaffold pro generování vysoce specifických vazebných molekul vůči různým cílům k terapeutickým a diagnostickým účelům (Lee et al., 2012).

9.5 OBody

Nové neimunoglobulinové alternativy protilátek vhodné pro tvorbu specifických vazebných molekul zvané OBody jsou založeny na struktuře OB foldu. OB fold je malý proteinový modul tvořený jednou β -barelovou doménou postrádající disulfidické můstky. Vyskytuje se v mnoha organismech, jako jsou archea, bakterie, kvasinky a savci a slouží k vazbě proteinů, oligonukleotidů, oligosacharidů a malých ligandů. Struktura a topologie OB foldu umožňují provádět modifikace klíčové pro specifickou vazbu různých cílových molekul, zároveň si vazebná molekula zachovává vysokou teplotní stabilitu, může být produkována a purifikována jako rozpustný protein z *Escherichia coli* ve velkém množství. Antikodon rozpoznávající doména z aspartyl tRNA syntetázy izolované z termofilní *Pyrococcus aerophilum* byla využita k tvorbě kombinatoriální knihovny, z níž byly pomocí fágového displeje a následné afinitní maturace selektovány specifické monomerní varianty s nanomolárními afinitami vůči modelové cílové molekule lysozymu získaného z vaječných bílků. Kombinatoriální knihovna čítající na 10^8 klonů byla generována na základě randomizace 17 aminokyselinových pozic na povrchu OB foldu pomocí PCR metody. Vazebné molekuly založené na OB foldu nacházejí potenciální využití v *in vitro* diagnostice, jako nástroje pro detekci a bioseparaci, případně lidský či deimunizovaný bakteriální OB fold může sloužit k produkci terapeutik (Stemson et al., 2014).

10 Další typy scaffoldů

Proteinové scaffoldy představují rychle se rozvíjející skupinu terapeutických a diagnostických molekul. Byly vytvořeny desítky scaffoldů, podle nichž byly odvozeny vazebné proteiny vůči více než stovce cílových molekul. Následující seznam zahrnuje další příklady významných proteinových scaffoldů včetně příslušných publikací.

- Armadillo repetitivní proteiny **(Parmeggiani et al., 2008)**
- Atrimery **(Allen et al., 2012)**
- Avimery **(Silverman et al., 2005)**
- Bicyklické peptidy **(Chen and Heinis, 2015)**
- Cyclotidy **(Troeira Henriques and Craik, 2017)**
- Cys-knot proteiny **(Silverman et al., 2009)**
- Karbohydrát vázající modul **(Cicortas Gunnarsson et al., 2004)**
- Kunitzova doména **(Weidle et al., 2013)**
- Macrocycles **(Beckmann et al., 2013)**
- Microbodies **(Schmoltdt et al., 2009)**
- Nanobodies **(Bruce et al., 2016)**
- Nanofitin **(Huet et al., 2015)**
- Pronectiny **(Skrlec et al., 2015)**
- Vazebné molekuly založené na CTLA-4 **(Nuttall et al., 1999)**

11 Závěr

Neimunoglobulinové vazebné proteiny představují nové, rychle se rozvíjející terapeutické a diagnostické nástroje, z nichž některé se nacházejí v pokročilých fázích klinických testů a mají potenciál stát se součástí nových léčiv. Nicméně proteiny založené na struktuře scaffoldu jsou stále v procesu vývoje a vyžadují mnohá vylepšení. Další modifikace těchto molekul by mohly vést k produkci proteinů s ještě menší molekulovou hmotností, která by mohla umožnit vytváření vazeb s intracelulárními molekulami, dále by mohlo dojít ke zvýšení jejich stability, specifity a afinity vůči mnoha novým cílovým strukturám. Urychlení a usnadnění produkce vazebných molekul by umožnilo snížit finanční náklady spojené s jejich výrobou a rozšířit jejich využití jako terapeutických molekul nebo diagnostických nástrojů například v zobrazovacích metodách.

Cílem mé bakalářské práce je představit nové proteinové scaffoldy a molekuly od nich odvozené, se zaměřením na nejznámější a nejvíce pokročilé typy struktur, za účelem shrnutí jejich stavby, vlastností a využití jako vazebných molekul. U konkrétních struktur podává informace ohledně jejich účasti v klinických testech a potenciálním využití v praxi. Bakalářská práce zahrnuje základní přehled selekčních technologií (tzv. displejů) včetně metod tvorby kombinatoriálních knihoven. Kapitola Nové scaffoldy je přehledem vybraných nejnovějších struktur, krátce se zabývám jejich charakteristikou a využitím. Kapitola Další typy scaffoldů zahrnuje abecední seznam dalších příkladů scaffoldových molekul, starších i novějších, které jsou významnými strukturami s velkým potenciálem.

12 Reference

Seznam použité literatury

Sekundární citace označeny *

- AHMAD, J. N., LI, J., BIEDERMANNNOVA, L., KUCHAR, M., SIPOVA, H., SEMERADTOVA, A., CERNY, J., PETROKOVA, H., MIKULECKY, P., POLINEK, J., STANEK, O., VONDRASEK, J., HOMOLA, J., MALY, J., OSICKA, R., SEBO, P. & MALY, P. 2012. Novel high-affinity binders of human interferon gamma derived from albumin-binding domain of protein G. *Proteins*, 80, 774-89.
- ALBRECHT, V., RICHTER, A., PFEIFFER, S., GEBAUER, M., LINDNER, S., GIESER, E., SCHULLER, U., SCHICHOR, C., GILDEHAUS, F. J., BARTENSTEIN, P., TONN, J. C., SKERRA, A. & GLASS, R. 2016. Anticalins directed against the fibronectin extra domain B as diagnostic tracers for glioblastomas. *Int J Cancer*, 138, 1269-80.
- ALLEN, J. E., FERRINI, R., DICKER, D. T., BATZER, G., CHEN, E., OLTEAN, D. I., LIN, B., RENSHAW, M. W., KRETZ-ROMMEL, A. & EL-DEIRY, W. S. 2012. Targeting TRAIL death receptor 4 with trivalent DR4 Atrimer complexes. *Mol Cancer Ther*, 11, 2087-95.
- ALM, T., YDERLAND, L., NILVEBRANT, J., HALLDIN, A. & HOBER, S. 2010. A small bispecific protein selected for orthogonal affinity purification. *Biotechnol J*, 5, 605-17.
- ANDREU, C. & DEL OLMO, M. L. 2017. Development of a new yeast surface display system based on Spi1 as an anchor protein. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101, 287-299.
- ARORA, P., OAS, T. G. & MYERS, J. K. 2004. Fast and faster: a designed variant of the B-domain of protein A folds in 3 microsec. *Protein Sci*, 13, 847-53.
- BARENDE, P. A., NG, D. T., MCQUADE, C. N. & SARKAR, C. A. 2013. Streamlined protocol for mRNA display. *ACS Comb Sci*, 15, 77-81.
- BARINKA, C., PTACEK, J., RICHTER, A., NOVAKOVA, Z., MORATH, V. & SKERRA, A. 2016. Selection and characterization of Anticalins targeting human prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Protein Eng Des Sel*, 29, 105-15.
- BECKMANN, H. S., NIE, F., HAGERMAN, C. E., JOHANSSON, H., TAN, Y. S., WILCKE, D. & SPRING, D. R. 2013. A strategy for the diversity-oriented synthesis of macrocyclic scaffolds using multidimensional coupling. *Nat Chem*, 5, 861-7.
- BESTE, G., SCHMIDT, F. S., STIBORA, T. & SKERRA, A. 1999. Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1898-903.
- *BINZ, H. K., AMSTUTZ, P., KOHL, A., STUMPP, M. T., BRIAND, C., FORRER, P., GRUTTER, M. G. & PLUCKTHUN, A. 2004. High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol*, 22, 575-82.
- BIRCHLER, M. T., MILISAVLIJEVIC, D., PFALTZ, M., NERI, D., ODERMATT, B., SCHMID, S. & STOECKLI, S. J. 2003. Expression of the extra domain B of fibronectin, a marker of angiogenesis, in head and neck tumors. *Laryngoscope*, 113, 1231-7.
- BODER, E. T. & WITTRUP, K. D. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, 15, 553-7.
- BORK, P. 1993. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins*, 17, 363-74.
- BRACK, S., ATTINGER-TOLLER, I., SCHADE, B., MOURLANE, F., KLUPSCH, K., WOODS, R., HACHEMI, H., VON DER BEY, U., KOENIG-FRIEDRICH, S., BERTSCHINGER, J. & GRABULOVSKI, D. 2014. A bispecific HER2-targeting

- FynomAb with superior antitumor activity and novel mode of action. *Mol Cancer Ther*, 13, 2030-9.
- BRUCE, V. J., LOPEZ-ISLAS, M. & MCNAUGHTON, B. R. 2016. Resurfaced cell-penetrating nanobodies: A potentially general scaffold for intracellularly targeted protein discovery. *Protein Sci*, 25, 1129-37.
- CAO, J., WEN, Z. M., DENG, S. H., ZHOU, X., CHEN, Q. L., LIAO, W. T., JIANG, S. H., JIA, J. A., QI, Z. T., SUN, S. H. & PAN, W. 2012. Phage-based molecular directed evolution yields multiple tandem human IgA affibodies with intramolecular binding avidity. *J Biotechnol*, 158, 120-7.
- CICORTAS GUNNARSSON, L., NORDBERG KARLSSON, E., ALBREKT, A. S., ANDERSSON, M., HOLST, O. & OHLIN, M. 2004. A carbohydrate binding module as a diversity-carrying scaffold. *Protein Eng Des Sel*, 17, 213-21.
- DE CHATEAU, M. & BJORCK, L. 1994. Protein PAB, a mosaic albumin-binding bacterial protein representing the first contemporary example of module shuffling. *J Biol Chem*, 269, 12147-51.
- DE CHATEAU, M., HOLST, E. & BJORCK, L. 1996. Protein PAB, an albumin-binding bacterial surface protein promoting growth and virulence. *J Biol Chem*, 271, 26609-15.
- DESMET, J., VERSTRAETE, K., BLOCH, Y., LORENT, E., WEN, Y., DEVREESE, B., VANDENBROUCKE, K., LOVERIX, S., HETTMANN, T., DEROO, S., SOMERS, K., HENDERIKX, P., LASTERS, I. & SAVVIDES, S. N. 2014. Structural basis of IL-23 antagonism by an Alphabody protein scaffold. *Nat Commun*, 5, 5237.
- DIEM, M. D., HYUN, L., YI, F., HIPPENSTEEL, R., KUHAR, E., LOWENSTEIN, C., SWIFT, E. J., O'NEIL, K. T. & JACOBS, S. A. 2014. Selection of high-affinity Centyrin FN3 domains from a simple library diversified at a combination of strand and loop positions. *Protein Eng Des Sel*, 27, 419-29.
- EGGENSTEIN, E., EICHINGER, A., KIM, H. J. & SKERRA, A. 2014. Structure-guided engineering of Anticalins with improved binding behavior and biochemical characteristics for application in radio-immuno imaging and/or therapy. *J Struct Biol*, 185, 203-14.
- ENGFELDT, T., RENBERG, B., BRUMER, H., NYGREN, P. A. & KARLSTROM, A. E. 2005. Chemical synthesis of triple-labelled three-helix bundle binding proteins for specific fluorescent detection of unlabelled protein. *Chembiochem*, 6, 1043-50.
- FLEGO, M., ASCIONE, A., CIANFRIGLIA, M. & VELLA, S. 2013. Clinical development of monoclonal antibody-based drugs in HIV and HCV diseases. *BMC Med*, 11, 4.
- FRIEDMAN, M., LINDSTROM, S., EKERLJUNG, L., ANDERSSON-SVAHN, H., CARLSSON, J., BRISMAR, H., GEDDA, L., FREJD, F. Y. & STAHL, S. 2009. Engineering and characterization of a bispecific HER2 x EGFR-binding affibody molecule. *Biotechnol Appl Biochem*, 54, 121-31.
- *GEBAUER, M. & SKERRA, A. 2009. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 13, 245-55.
- GRABULOVSKI, D., KASPAR, M. & NERI, D. 2007. A novel, non-immunogenic Fyn SH3-derived binding protein with tumor vascular targeting properties. *J Biol Chem*, 282, 3196-204.
- GRIMM, S., YU, F. & NYGREN, P. A. 2011. Ribosome display selection of a murine IgG(1) Fab binding affibody molecule allowing species selective recovery of monoclonal antibodies. *Mol Biotechnol*, 48, 263-76.
- GRONWALL, C., SJOBERG, A., RAMSTROM, M., HOIDEN-GUTHENBERG, I., HOBBER, S., JONASSON, P. & STAHL, S. 2007. Affibody-mediated transferrin depletion for proteomics applications. *Biotechnol J*, 2, 1389-98.

- HANES, J. & PLUCKTHUN, A. 1997. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4937-42.
- HUDZIAK, R. M., SCHLESSINGER, J. & ULLRICH, A. 1987. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7159-63.
- HUET, S., GORRE, H., PERROCHEAU, A., PICOT, J. & CINIÉ, M. 2015. Use of the Nanofitin Alternative Scaffold as a GFP-Ready Fusion Tag. *PLoS One*, 10, e0142304.
- CHEN, S. & HEINIS, C. 2015. Phage selection of bicyclic peptides based on two disulfide bridges. *Methods Mol Biol*, 1248, 119-37.
- CHRISTMANN, A., WALTER, K., WENTZEL, A., KRATZNER, R. & KOLMAR, H. 1999. The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for Escherichia coli cell surface display of conformationally constrained peptides. *Protein Eng*, 12, 797-806.
- IACOB, R. E., CHEN, G., AHN, J., HOUEL, S., WEI, H., MO, J., TAO, L., COHEN, D., XIE, D., LIN, Z., MORIN, P. E., DOYLE, M. L., TYMIAK, A. A. & ENGEN, J. R. 2014. The influence of adnectin binding on the extracellular domain of epidermal growth factor receptor. *J Am Soc Mass Spectrom*, 25, 2093-102.
- JACOBSEN, L., BECHTOLD, C., TIRUCHERAI, G., AHLIJANIAN, M. & LUO, F. 2016. P.15: BMS-986089: A novel adnectin protein that dose dependently lowers free myostatin and increases muscle volume and lean body mass. *Neuromuscular Disorders*, 26, S95.
- JOHANSSON, M. U., DE CHATEAU, M., BJORCK, L., FORSEN, S., DRAKENBERG, T. & WIKSTROM, M. 1995. The GA module, a mobile albumin-binding bacterial domain, adopts a three-helix-bundle structure. *FEBS Lett*, 374, 257-61.
- KOIDE, A., ABBATIello, S., ROTHGERY, L. & KOIDE, S. 2002. Probing protein conformational changes in living cells by using designer binding proteins: application to the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1253-8.
- KOIDE, A., BAILEY, C. W., HUANG, X. & KOIDE, S. 1998. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol*, 284, 1141-51.
- KRIZOVA, L., KUCHAR, M., PETROKOVA, H., OSICKA, R., HLAVNICKOVA, M., PELAK, O., CERNY, J., KALINA, T. & MALY, P. 2017. p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells. *Autoimmunity*, 50, 102-113.
- KUCHAR, M., VANKOVA, L., PETROKOVA, H., CERNY, J., OSICKA, R., PELAK, O., SIPOVA, H., SCHNEIDER, B., HOMOLA, J., SEBO, P., KALINA, T. & MALY, P. 2014. Human interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent ex vivo expansion of IL-17-producing T-cells. *Proteins*, 82, 975-89.
- *KUZMICHEVA, G. A. & BELYAVSKAYA, V. A. 2016. [Peptide phage display in biotechnology and biomedicine]. *Biomed Khim*, 62, 481-495.
- LEE, S. C., PARK, K., HAN, J., LEE, J. J., KIM, H. J., HONG, S., HEU, W., KIM, Y. J., HA, J. S., LEE, S. G., CHEONG, H. K., JEON, Y. H., KIM, D. & KIM, H. S. 2012. Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 3299-304.
- LINDBERG, H., JOHANSSON, A., HARD, T., STAHL, S. & LOFBLUM, J. 2013. Staphylococcal display for combinatorial protein engineering of a head-to-tail affibody dimer binding the Alzheimer amyloid-beta peptide. *Biotechnol J*, 8, 139-45.
- MAIN, A. L., HARVEY, T. S., BARON, M., BOYD, J. & CAMPBELL, I. D. 1992. The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell*, 71, 671-8.

- MAMLUK, R., CARVAJAL, I. M., MORSE, B. A., WONG, H., ABRAMOWITZ, J., ASLANIAN, S., LIM, A. C., GOKEMEIJER, J., STOREK, M. J., LEE, J., GOSSELIN, M., WRIGHT, M. C., CAMPHAUSEN, R. T., WANG, J., CHEN, Y., MILLER, K., SANDERS, K., SHORT, S., SPERINDE, J., PRASAD, G., WILLIAMS, S., KERBEL, R., EBOS, J., MUTSAERS, A., MENDLEIN, J. D., HARRIS, A. S. & FURFINE, E. S. 2010. Anti-tumor effect of CT-322 as an adnectin inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Mabs*, 2, 199-208.
- MAREČKOVÁ, L., PETROKOVÁ, H., OSIČKA, R., KUCHAR, M. & MALÝ, P. 2015. Novel binders derived from an albumin-binding domain scaffold targeting human prostate secretory protein 94 (PSP94). *Protein & Cell*, 6, 774-779.
- MITCHELL, T., CHAO, G., SITKOFF, D., LO, F., MONSHIZADEGAN, H., MEYERS, D., LOW, S., RUSSO, K., DIBELLA, R., DENHEZ, F., GAO, M., MYERS, J., DUKE, G., WITMER, M., MIAO, B., HO, S. P., KHAN, J. & PARKER, R. A. 2014. Pharmacologic profile of the Adnectin BMS-962476, a small protein biologic alternative to PCSK9 antibodies for low-density lipoprotein lowering. *J Pharmacol Exp Ther*, 350, 412-24.
- MROSS, K., RICHLI, H., FISCHER, R., SCHARR, D., BUCHERT, M., STERN, A., GILLE, H., AUDOLY, L. P. & SCHEULEN, M. E. 2013. First-in-human phase I study of PRS-050 (Angiocal), an Anticalin targeting and antagonizing VEGF-A, in patients with advanced solid tumors. *PLoS One*, 8, e83232.
- MURDOCH, D. A. & SHAH, H. N. 1999. Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as *Finegoldia magna* comb. nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 as *Micromonas micros* comb. nov. *Anaerobe*, 5, 555-559.
- *NEYLON, C. 2004. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res*, 32, 1448-59.
- NILVEBRANT, J., ALM, T., HOBER, S. & LOFBLUM, J. 2011. Engineering bispecificity into a single albumin-binding domain. *PLoS One*, 6, e25791.
- NILVEBRANT, J., ASTRAND, M., LOFBLUM, J. & HOBER, S. 2013. Development and characterization of small bispecific albumin-binding domains with high affinity for ErbB3. *Cell Mol Life Sci*, 70, 3973-85.
- *NILVEBRANT, J. & HOBER, S. 2013. The albumin-binding domain as a scaffold for protein engineering. *Comput Struct Biotechnol J*, 6, e201303009.
- *NORD, K., GUNNERIUSSON, E., RINGDAHL, J., STAHL, S., UHLEN, M. & NYGREN, P. A. 1997. Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol*, 15, 772-7.
- NUTTALL, S. D., ROUSCH, M. J., IRVING, R. A., HUFTON, S. E., HOOGENBOOM, H. R. & HUDSON, P. J. 1999. Design and expression of soluble CTLA-4 variable domain as a scaffold for the display of functional polypeptides. *Proteins*, 36, 217-27.
- NYGREN, P. A., ELIASSON, M., ABRAHMSSEN, L., UHLEN, M. & PALMCRANTZ, E. 1988. Analysis and use of the serum albumin binding domains of streptococcal protein G. *J Mol Recognit*, 1, 69-74.
- OPPMANN, B., LESLEY, R., BLOM, B., TIMANS, J. C., XU, Y., HUNTE, B., VEGA, F., YU, N., WANG, J., SINGH, K., ZONIN, F., VAISBERG, E., CHURAKOVA, T., LIU, M., GORMAN, D., WAGNER, J., ZURAWSKI, S., LIU, Y., ABRAMS, J. S., MOORE, K. W., RENNICK, D., DE WAAL-MALEFYT, R., HANNUM, C., BAZAN, J. F. & KASTELEIN, R. A. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 13, 715-25.

- ORLOVA, A., MAGNUSSON, M., ERIKSSON, T. L., NILSSON, M., LARSSON, B., HÖIDÉN-GUTHENBERG, I., WIDSTRÖM, C., CARLSSON, J., TOLMACHEV, V. & STÅHL, S. 2006. Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule. *Cancer research*, 66, 4339-4348.
- *PARKER, M. H., CHEN, Y., DANEHY, F., DUFU, K., EKSTROM, J., GETMANOVA, E., GOKEMEIJER, J., XU, L. & LIPOVSEK, D. 2005. Antibody mimics based on human fibronectin type three domain engineered for thermostability and high-affinity binding to vascular endothelial growth factor receptor two. *Protein Eng Des Sel*, 18, 435-44.
- PARMEGGIANI, F., PELLARIN, R., LARSEN, A. P., VARADAMSETTY, G., STUMPP, M. T., ZERBE, O., CAFLISCH, A. & PLUCKTHUN, A. 2008. Designed armadillo repeat proteins as general peptide-binding scaffolds: consensus design and computational optimization of the hydrophobic core. *J Mol Biol*, 376, 1282-304.
- RAUTH, S., HINZ, D., BORGER, M., UHRIG, M., MAYHAUS, M., RIEMENSCHNEIDER, M. & SKERRA, A. 2016. High-affinity Anticalins with aggregation-blocking activity directed against the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Biochem J*, 473, 1563-78.
- RICHTER, A. & SKERRA, A. 2017. Anticalins directed against vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) with picomolar affinities show potential for medical therapy and in vivo imaging. *Biol Chem*, 398, 39-55.
- ROBERTS, R. W. & SZOSTAK, J. W. 1997. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12297-302.
- RODON, J., OMLIN, A., HERBSCHLEB, K. H., GARCIA-CORBACHO, J., STEINER, J., DOLADO, I., ZITT, C., FEURSTEIN, D., TURNER, D., DAWSON, K. M., STUMPP, M. T., GILBOY, P., HARSTRICK, A., AZARO, A., ACKERMANN, C. J., MIDDLETON, M. R. & BAIRD, R. D. 2015. Abstract B25: First-in-human Phase I study to evaluate MP0250, a DARPIn blocking HGF and VEGF, in patients with advanced solid tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14, B25-B25.
- SANDSTROM, K., XU, Z., FORSBERG, G. & NYGREN, P. A. 2003. Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding affibody ligand developed by combinatorial protein engineering. *Protein Eng*, 16, 691-7.
- *SCHIFF, D., KESARI, S., DE GROOT, J., MIKKELSEN, T., DRAPPATZ, J., COYLE, T., FICHTEL, L., SILVER, B., WALTERS, I. & REARDON, D. 2015. Phase 2 study of CT-322, a targeted biologic inhibitor of VEGFR-2 based on a domain of human fibronectin, in recurrent glioblastoma. *Investigational New Drugs*, 33, 247-253.
- SCHLATTER, D., BRACK, S., BANNER, D. W., BATEY, S., BENZ, J., BERTSCHINGER, J., HUBER, W., JOSEPH, C., RUFER, A., VAN DER KLOOSTER, A., WEBER, M., GRABULOVSKI, D. & HENNIG, M. 2012. Generation, characterization and structural data of chymase binding proteins based on the human Fyn kinase SH3 domain. *MAbs*, 4, 497-508.
- SCHLEHUBER, S. & SKERRA, A. 2001. Duocalins: engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol Chem*, 382, 1335-42.
- SCHMOLDT, H. U., DANESCHDAR, M., KOLMAR, H. & BLIND, M. 2009. Microbodies. *Methods Mol Biol*, 535, 361-72.
- SILACCI, M., BAENZIGER-TOBLER, N., LEMBKE, W., ZHA, W., BATEY, S., BERTSCHINGER, J. & GRABULOVSKI, D. 2014. Linker length matters, fynomer-Fc fusion with an optimized linker displaying picomolar IL-17A inhibition potency. *J Biol Chem*, 289, 14392-8.
- SILACCI, M., LEMBKE, W., WOODS, R., ATTINGER-TOLLER, I., BAENZIGER-TOBLER, N., BATEY, S., SANTIMARIA, R., VON DER BEY, U., KOENIG-FRIEDRICH, S., ZHA, W., SCHLERETH, B., LOCHER, M., BERTSCHINGER, J. & GRABULOVSKI, D. 2016. Discovery and characterization of COVA322, a clinical-

- stage bispecific TNF/IL-17A inhibitor for the treatment of inflammatory diseases. *MAbs*, 8, 141-9.
- SILVERMAN, A. P., LEVIN, A. M., LAHTI, J. L. & COCHRAN, J. R. 2009. Engineered cystine-knot peptides that bind alpha(v)beta(3) integrin with antibody-like affinities. *J Mol Biol*, 385, 1064-75.
- SILVERMAN, J., LIU, Q., BAKKER, A., TO, W., DUGUAY, A., ALBA, B. M., SMITH, R., RIVAS, A., LI, P., LE, H., WHITEHORN, E., MOORE, K. W., SWIMMER, C., PERLROTH, V., VOGT, M., KOLKMAN, J. & STEMMER, W. P. 2005. Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat Biotechnol*, 23, 1556-61.
- SKRLEC, K., STRUKELJ, B. & BERLEC, A. 2015. Non-immunoglobulin scaffolds: a focus on their targets. *Trends Biotechnol*, 33, 408-18.
- SMITH, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 1315-7.
- STAHL, A., STUMPP, M. T., SCHLEGEL, A., EKAWARDHANI, S., LEHRLING, C., MARTIN, G., GULOTTI-GEORGIEVA, M., VILLEMAGNE, D., FORRER, P., AGOSTINI, H. T. & BINZ, H. K. 2013. Highly potent VEGF-A-antagonistic DARPins as anti-angiogenic agents for topical and intravitreal applications. *Angiogenesis*, 16, 101-11.
- STEEMSON, J. D., BAAKE, M., RAKONJAC, J., ARCUS, V. L. & LIDDAMENT, M. T. 2014. Tracking molecular recognition at the atomic level with a new protein scaffold based on the OB-fold. *PLoS One*, 9, e86050.
- STERN, L. A., CASE, B. A. & HACKEL, B. J. 2013. Alternative Non-Antibody Protein Scaffolds for Molecular Imaging of Cancer. *Curr Opin Chem Eng*, 2.
- ŠÍPOVÁ, H., ŠEVCŮ, V., KUCHAR, M., AHMAD, J. N., MIKULECKÝ, P., OSÍČKA, R., MALÝ, P. & HOMOLA, J. 2012. Surface plasmon resonance biosensor based on engineered proteins for direct detection of interferon-gamma in diluted blood plasma. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 174, 306-311.
- TIEDE, C., TANG, A. A. S., MANDAL, U., TOMLINSON, D. C., MCPHERSON, M. J., DEACON, S. E., GEORGE, S. E., HARRISON, D. J., NETTLESHIP, J. E., OWENS, R. J. & OWEN, R. L. 2014. Adhiron: A stable and versatile peptide display scaffold for molecular recognition applications. *Protein Engineering, Design and Selection*, 27, 145-155.
- TROEIRA HENRIQUES, S. & CRAIK, D. J. 2017. Cyclotide Structure and Function: The Role of Membrane Binding and Permeation. *Biochemistry*, 56, 669-682.
- UHLÉN, M., GUSS, B., NILSSON, B., GATENBECK, S., PHILIPSON, L. & LINDBERG, M. 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem*, 259, 1695-702.
- *VAZQUEZ-LOMBARDI, R., PHAN, T. G., ZIMMERMANN, C., LOWE, D., JERMUTUS, L. & CHRIST, D. 2015. Challenges and opportunities for non-antibody scaffold drugs. *Drug Discov Today*, 20, 1271-83.
- VOGT, M. & SKERRA, A. 2004. Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. *ChemBiochem*, 5, 191-9.
- *WANG, T. W., ZHU, H., MA, X. Y., ZHANG, T., MA, Y. S. & WEI, D. Z. 2006. Mutant library construction in directed molecular evolution: casting a wider net. *Mol Biotechnol*, 34, 55-68.
- WANG, Y., BALLOU, B., SCHMIDT, B. F., ANDREKO, S., CROIX, C. M. S., WATKINS, S. C. & BRUCHEZ, M. P. 2017. Affibody-targeted fluorogen activating protein for in vivo tumor imaging. *Chemical Communications*.

- WEIDLE, U. H., AUER, J., BRINKMANN, U., GEORGES, G. & TIEFENTHALER, G. 2013. The emerging role of new protein scaffold-based agents for treatment of cancer. *Cancer Genomics Proteomics*, 10, 155-68.
- *WEISS, G. A., WATANABE, C. K., ZHONG, A., GODDARD, A. & SIDHU, S. S. 2000. Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8950-4.
- WIKMAN, M., ROWCLIFFE, E., FRIEDMAN, M., HENNING, P., LINDHOLM, L., OLOFSSON, S. & STAHL, S. 2006. Selection and characterization of an HIV-1 gp120-binding affibody ligand. *Biotechnol Appl Biochem*, 45, 93-105.
- ZAHND, C., PECORARI, F., STRAUMANN, N., WYLER, E. & PLUCKTHUN, A. 2006. Selection and characterization of Her2 binding-designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem*, 281, 35167-75.

Internetové zdroje

- MOLECULAR PARTNERS. *MP0250 and MP0274* [Online]. Available: <http://www.molecularpartners.com/our-products/mp0250mp0274/> [Accessed 27.3.2017].
- PHARMACEUTICALS, P. 2015. Available: <http://www.pieris.com/news-and-events/press-releases/detail/524/pieris-pharmaceuticals-presents-clinical-data-for-its> [Accessed].

Patenty

- DESMET, J., LASTERS, I. & LOVERIX, S. 2010. Single-chain antiparallel coiled coil proteins. Google Patents.

Klinické studie

- NCT01141257 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01141257>
- NCT02515669 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02515669>
- NCT01587365 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01587365>
- NCT02243787 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02243787>