

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory:  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Petr Tauš**

Terapeutické využití alternativních vazebných proteinů cílící nádorové biomarkery v  
klinickém testování onkologických pacientů

Therapeutic use of alternative protein binders targeting tumor biomarkers in  
clinical testing of oncology patients

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.  
Praha 2015

## **Poděkování:**

Děkuji svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. za odborné konzultace a trpělivost. Zároveň bych chtěl poděkovat svým přátelům a rodinně za podporu při psaní bakalářské práce.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně na základě konzultací se školitelem a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2015

Petr Tauš

## **Abstrakt:**

Téměř až do konce minulého století byly protilátky (imunoglobuliny) považovány za jediné vazebné proteiny schopné specifické vazby. Objev hybridomové technologie v roce 1975 umožnil vytváření monoklonálních protilátek, které po dvaceti letech vstoupily do klinické praxe. V této době byly objeveny první neimunoglobulinové proteinové struktury vhodné pro vytvoření specifického vazebného místa. Do dnešní doby bylo popsáno mnoho odlišných struktur, ale pouze několik z nich je dále vyvíjeno jako diagnostika, terapeutika nebo jako nástroje ve výzkumu. Tyto struktury nejsou zatíženy nedostatky imunoglobulinů, jako je velikost, drahá výroba a obtížný racionální návrh, a proto mají potenciál nahradit a překonat současné využití protilátek. V této bakalářské práci jsou shrnuty veškeré struktury, které jsou ve vývoji a jsou popsány zástupci v klinickém testování v oblasti nádorových terapeutik v porovnání s některými schválenými imunoglobulinovými biolécivými.

## **Klíčová slova:**

Alternativní vazebné proteiny, protilátková mimetika, klinické testování, rakovina, bioléciva, cílená léčba, proteinový scaffold, struktura proteinů, proteiny s vysokou afinitou, technologie displejů

## **Abstract:**

Almost until the end of the last century, antibodies (aka immunoglobulins) were considered the only class of specific binding proteins. The discovery of hybridoma technology in 1975 had enabled the production of monoclonal antibodies and after twenty years some of them have entered clinical practice. Meanwhile, the first non-immunoglobulin protein scaffold, in which new specific binding sites could be introduced was discovered. To date, many different alternative scaffolds have been described, but only a few of them are being further developed for diagnostics, therapeutics or tools in basic research. Since these structures are overcoming the drawbacks of immunoglobulin structure, which are big size, expensive production and difficult rational design, they have potential to replace and exceed them. In this bachelor's thesis all the alternative scaffolds in development are summarized. Moreover, their advancements in clinical trials are described and compared with approved therapeutics based on immunoglobulin structure.

## **Keywords:**

Alternative binding proteins, antibody mimetics, clinical trials, cancer, biopharmaceutical, targeted therapy, protein scaffold, protein structure, high affinity binding proteins, display technology

## Seznam zkratek:

AK	aminokyselina	
AVP	alternativní vazebný protein	
BiTE		bispecific T cell engager
CDR	regiony určující komplementaritu	complementarity determining region
CNS	centrální nervová soustava	
ED-B	extradoména B fibronectinu	fibronectin extra domain B
Fab	protilátkový antigen vazebný fragment	antibody fragment antigen binding
Fc	protilátkový konstantní fragment	antibody fragment crystallizable
GBM	nádor mozku glioblastom	glioblastoma multiforme
Ig	imunoglobulin	immunoglobulin
K <sub>D</sub>	disociační konstanta	
mAbs	monoklonální protilátky	monoclonal antibodies
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic	non-small-cell-lung cancer
OS	celková doba přežití	overall survival
pAbs	polyklonální protilátky	polyclonal antibodies
PFS	doba přežití bez progrese	progression free survival
scFv	jednořetězcový variabilní fragment	single-chain variable fragment
TandAbs		tandem diabodies

## Obsah

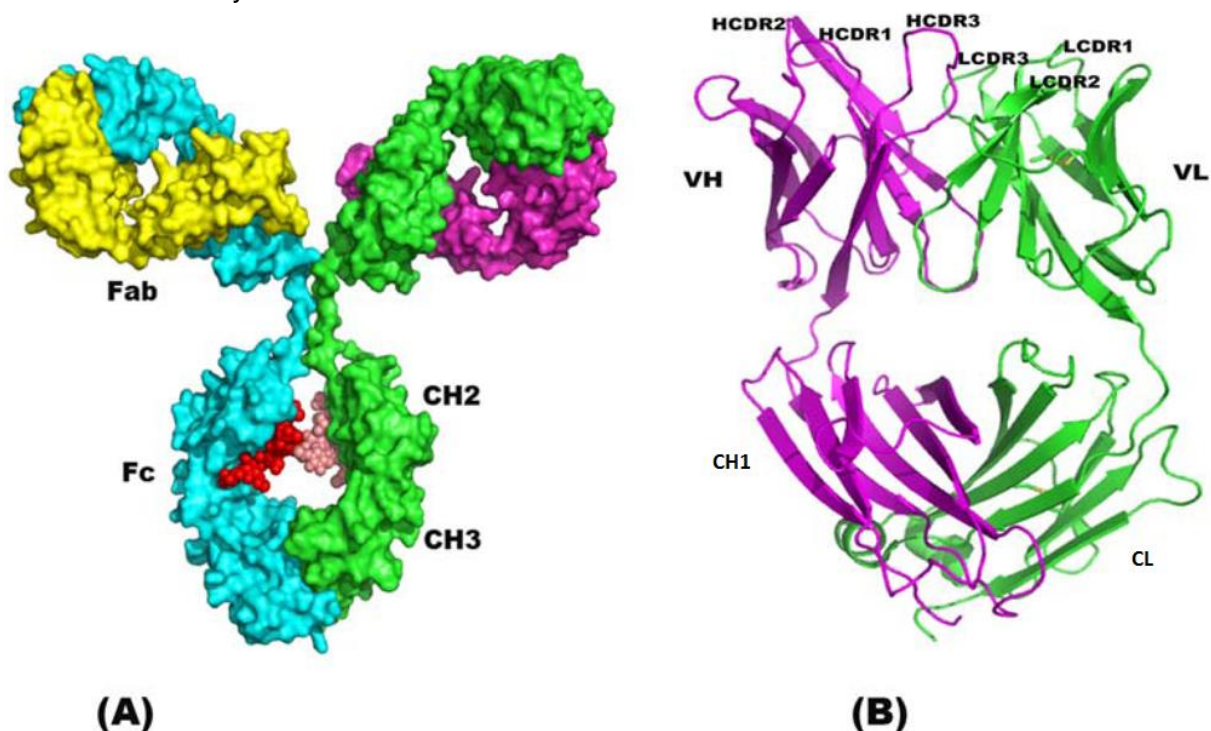
1. Úvod .....	1
1.1. Úvod .....	1
1.2. Bioléčiva .....	3
1.3. Od molekuly k léku – Preklinická fáze.....	4
1.4. Od molekuly k léku – Klinická fáze.....	4
2. AVP na základě Ig struktury .....	5
2.1. Motivace .....	5
2.2. Jednořetězcové variabilní fragmenty .....	6
2.2.1. BiTE .....	6
2.2.2. TandAbs.....	7
2.3. ‚Třetí generace‘ protilátkových vazebných fragmentů.....	7
3. AVP na základě ne-Ig struktury.....	8
3.1. Motivace .....	8
3.2. AVP v preklinické/klinické fázi cílicí nádorové biomarkery .....	8
3.2.1. Adnectin (=monobody) .....	9
3.2.2. Affibody.....	10
3.2.3. Affilin .....	11
3.2.4. Anticalin .....	12
3.2.5. DARPs (Designed Ankyrin Repeat Proteins).....	13
3.2.6. Fynomer.....	15
3.2.7. Repebody .....	15
3.3. Ostatní pokročilé AVP .....	17
4. AVP v klinickém testování .....	19
4.1. Cílená antiangiogenní terapie .....	19
4.2. CT-322.....	20
4.3. PRS-050 .....	22
4.4. MP0250 .....	23
5. Schválená antiangiogenní bioléčiva.....	23
5.1. Bevacizumab .....	23
5.2. Ramucirumab .....	24
5.3. Aflibercept.....	24
6. Porovnání AVP v KT se schválenými antiangiogenními bioléčivy.....	25
7. Závěr .....	27
8. Použitá literatura.....	28

# 1. Úvod

## 1.1. Úvod

Již na začátku 20. století Paul Ehrlich postuloval myšlenku ‚magické střely‘ (z anglického originálu ‚magic bullet‘). Koncept ‚magické střely‘ představoval sloučeninu, která by specificky cílila a ničila pouze patogeny, respektive toxiny. Klíčovým krokem k realizaci Ehrlichovy vize byl objev hybridomové technologie Georgesem Köhlerem a Césarem Milsteinem v roce 1975 (Kohler a Milstein, 1975). Tento objev umožnil produkci monoklonálních protilátek (dále mAbs). Princip hybridomové technologie spočívá ve fúzi B-lymfocytů (produkcujících požadovanou protilátku) s nádorovými buňkami myelomu. Z této fúze vznikají nesmrtelné hybridní buňky produkující mAbs. O významnosti tohoto objevu svědčí udělení Nobelovy ceny v roce 1984.

Protilátky se dělí do pěti tříd – IgM, IgD, IgG, IgE a IgA. Skládají se ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců spojených disulfidickými můstky. Ve své struktuře mají odlišné funkční jednotky: antigen vazebný fragment (dále Fab, z angl. fragment antigen binding) a konstantní fragment (dále Fc, z angl. fragment crystallizable region). Fab obsahuje variabilní doménu lehkého a těžkého řetězce a v každé z nich se nachází tři hypervariabilní smyčky CDR (z angl. Complementarity Determining Regions), které zprostředkovávají specifickou vazbu protilátky k antigenu. Přes Fc protilátka interaguje s Fc receptory na buňkách imunitního systému.



Obrázek 1 **IgG struktura.** (A) Protilátka ve tvaru Y se skládá ze dvou Fab ‚ramení‘ a Fc ‚nohy‘. Tyto regiony jsou propojeny disulfidickými můstky, které umožňují strukturní flexibilitu. Těžké řetězce obsahující tři konstantní (CH1-3) a jednu variabilní doménu (VH) jsou značeny zeleně a modře a lehké řetězce obsahující jednu konstantní (CL) a jednu variabilní (VL) doménu žlutě a purpurově. V Fc regionu jsou značeny červeně a růžově postranslačně připojené sacharidy. (B) Detail Fab s označenými CDR (HCDR1-3 a LCDR1-3) zprostředkovávající specifickou vazbu protilátky k antigenu. V tomto případě je těžký řetězec značen purpurově a lehký zeleně. Přijato od (Murali a Greene, 2012).

MAbs pocházejí ze stejného klonu plazmocytu (diferencovaný B-lymfocyt) a jsou tedy identické. Oproti tomu polyklonální protilátky (dále pAbs) pocházející z různých klonů plazmocytů obsahují různé variabilní regiony. PAbs na rozdíl od mAbs vznikají v těle v přirozené imunitní reakci. Jejich potenciální terapeutickou výhodou oproti mAbs je schopnost specificky cílit více různých epitopů na nádorových buňkách. Tím je dosaženo vyšší destrukční účinnosti nádorů a nižší pravděpodobnost vzniku nádorové rezistence, která často vzniká při použití terapeutických mAbs. Nicméně, tradiční přípravou pAbs izolací z imunizovaného zvířete je prakticky nemožné dosáhnout reprodukovatelnosti šarží (tzv. „batch to batch reproducibility“). A to je doposud hlavním důvodem jejich omezeného využití v klinické praxi. Cílem současného vývoje je nalezení technologie umožňující vytvářet stejně definované šarže pAbs (Waltz, 2006).

V počátcích vývoje mAbs jako terapeutik v osmdesátých letech bylo před vědce postaveno několik překážek. První připravené terapeutické myší protilátky byly velmi imunogenní a vykazovaly v klinickém testování nedostatečnou účinnost a vysokou hodnotu clearance (z angl. clear = čistit) zapříčiněnou vznikem lidských protilátek proti myším epitopům. Byly navrženy dva způsoby překonání problému – příprava humanizovaných a chimerických mAbs a příprava plně lidských mAbs. Chimerické mAbs byly připraveny pomocí metod genového inženýrství nahrazením myšího Fc regionu lidským. U humanizovaných mAbs je myšího původu pouze vazebná oblast. Produkce plně lidských mAbs pomocí hybridomové technologie se nedařila. Zlom nastal na počátku devadesátých let rozvojem dvou metod - technologie fágových displejů a přípravy transgenních myší. Tyto technologie umožnily výrobu lidských mAbs a také umožnily studium jednotlivých protilátkových fragmentů (Reichert et al., 2005).

Využití mAbs jako terapeutik je omezeno několika nedostatky, které plynou z jejich struktury a biofyzikálních vlastností. Mezi tyto nedostatky patří jejich velká velikost (~ 155 kDa u nejčastěji v imunoterapii používané IgG) omezující pronikání tkáněmi a nemožnost cílit některé skryté epitopy, nákladná výroba a obtížný racionální návrh. S cílem překonat tyto nedostatky jsou vyvíjeny jednotlivé protilátkové fragmenty. Ovšem jejich terapeutické uplatnění je bržděno vyskytujícími se problémy, jako je nestabilita ve vodném prostředí a tendence vzájemně agregovat. Z těchto důvodů se výzkum v posledních zhruba patnácti letech začíná se zvyšující mírou věnovat alternativním vazebným proteinům (dále AVP), které jsou někdy v literatuře označovány jako alternativní antigen-vázací formáty, proteinové scaffolds, proteiny s vysokou afinitou a protilátková mimetika. AVP jsou produkovány na základě malých (obvyklá vel. ~ 10-20 kDa) robustních proteinových struktur, na kterých je vytvářeno nové vazebné místo. V literatuře někdy bývají protilátkové fragmenty zařazeny mezi AVP, které se rozdělují do dvou skupin – AVP na základě imunoglobulinové (dále Ig) struktury (=protilátkové fragmenty) a AVP na základě ne-Ig struktury. V této bakalářské práci se zaměřím na AVP na základě ne-Ig struktury určené k nádorové terapii a cílicí především extracelulární cíle. Popíšu pokročilejší struktury, které jsou v preklinickém nebo v klinickém vývoji a zvláště ty molekuly, které se dostaly do klinického testování léčby nádorových chorob a porovnáám je s některými schválenými biolécivými (viz. kapitola 1.2.). AVP jsou nejčastěji ze začátku vyvíjené jako citlivé diagnostické soupravy a bisenzory a až s postupem času, když se například prokáže jejich inhibiční účinek na vazbu ligandu, začnou být vyvíjené jako terapeutika.

Existují dvě hlavní možnosti přípravy AVP – řízená evoluce a racionální návrh. Řízená evoluce je metoda v proteinovém inženýrství napodobující proces přirozeného výběru. Jejím principem je vytvoření komplexních kombinatorických knihoven proteinových variant, ze kterých jsou selektovány proteiny s požadovanými vlastnostmi. Tři zásadní kroky jsou mutagenese (vytvoření knihoven), selekce a amplifikace selektovaných variant. Tyto kroky jsou opakovány v cyklech do doby, než je vyselektována proteinová varianta s námi požadovanými vlastnostmi. Nejčastěji je selekce prováděna metodou fágového displeje při, které jsou proteiny vytvářené fágem vkládány do jeho obalu. Další často používané metody k selekci jsou *in vitro* ribosomální displeje, kvasinkové displeje a mRNA displeje. Například výhoda kvasinkového displeje je v jeho eukaryotní expresi a zpracování. U racionálního návrhu jsou mutace vnášeny cíleně na základě matematických a strukturních modelů. S výhodou jsou metody řízené evoluce a racionálního návrhu kombinovány.

Malá velikost AVP je příčinou vysoké renální clearance a tudíž krátkého poločasu života v plazmě. Ten je výhodou v diagnostickém využití, ale způsobuje komplikace v terapii. Léčivo se za krátkou dobu nedostane ke svému cíli v účinné koncentraci a je potřeba více častějších dávek. Proto bylo vyvinuto několik strategií používaných k prodloužení poločasu života proteinů v plazmě. Tyto strategie nejčastěji cílí zvýšení hydrodynamického objemu proteinu nebo využívají endozomální recyklační procesy zprostředkované neonatálním Fc receptorem. Využití recyklačního procesu je dosaženo například fúzí proteinu s albuminem nebo s Fc doménou IgG. Příkladem zvýšení hydrodynamického objemu je připojení vysoce flexibilní a hydrofilní molekuly polyethylenglykolu, tzv. PEGylace ([shrnutí v Kontermann, 2011](#)).

Kromě specificky vazebných molekul proteinové povahy jsou ve vývoji i specificky vazebné nukleové kyseliny tzv. aptamery. Jsou to krátké (20-80 nukleotidů), jednovláknové ribo- či deoxyribonukleotidy, které zauímají trojrozměrnou strukturu. S vysokou afinitou podobnou protilátkám váží malé cílové molekuly. Aptamery již dosáhly významného úspěchu schválením léčiva Macugen (pegaptanib) k léčbě lidské makulární degenerace. Tento úspěch byl motivací k výzkumu aptamerů pro nádorovou léčbu. V současné době je celá řada aptamerů cílící nejrůznější nádorové biomarkery v preklinických nebo v klinických studiích ([shrnutí v Zhu et al., 2014](#))

## 1.2. Bioléčiva

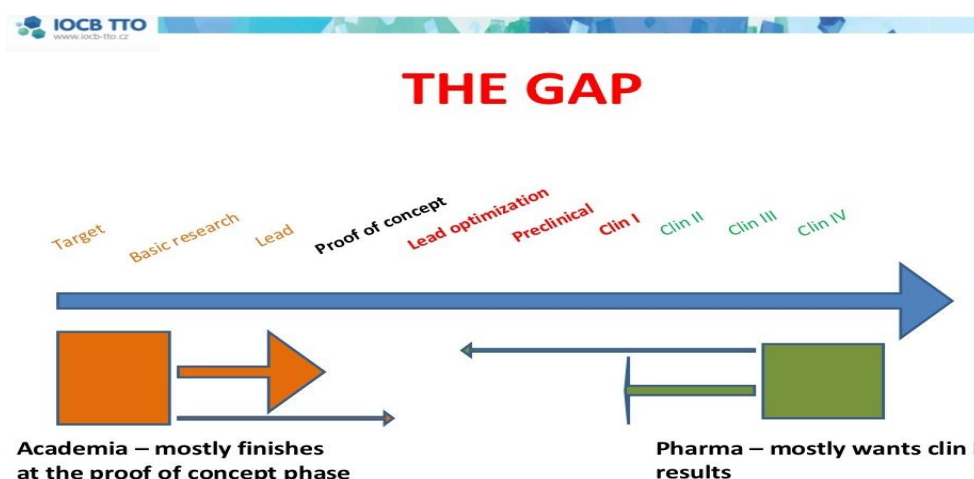
AVP a mAbs se řadí mezi tzv. bioléčiva. Bioléčiva jsou vyráběna pomocí biotechnologických postupů převážně v geneticky modifikovaných organismech. Na rozdíl od chemických léčiv o velikosti typicky pod 1 kDa se známou strukturou nemusí být struktura bioléčiv vždy plně charakterizována. Naopak vždy musí být charakterizována jejich funkce, specifita a výrobní proces. Bioléčiva můžeme z historického pohledu rozdělit na tři generace. Do první generace patří malé molekuly, jako jsou antibiotika a alkaloidy, které jsou v zásadě připravené synteticky, ale jsou produkovány ekonomičtěji biologickou cestou. Do druhé generace se řadí AVP a mAbs spolu s rekombinantními faktory krve, rekombinantními hormony, rekombinantními vakcínami, rekombinantními enzymy, rekombinantními fúzními proteiny a cytokiny. A nakonec jako třetí generace bývá označována genová terapie. Od roku



1986, kdy byla první mAb schválena, do června 2014 se na americký nebo evropský trh dostalo celkem 24 onkologických bioléciv. Nicméně již tři byly z trhu staženy a v současnosti (k roku 2014) je na americkém nebo evropském trhu k dostání 21 onkologických bioléciv. Z toho dva cytokiny, dvě rekombinantní vakcíny, 15 mAbs a dva rekombinantní fúzní proteiny (Walsh, 2014).

### 1.3. Od molekuly k léku – Preklinická fáze

Vývoj originálního léčiva lze rozdělit do tří navazujících fází - výzkumná fáze, preklinická fáze a klinické testování (dále KT). Prvním krokem v moderním výzkumu léčiv je zjištění co způsobuje chorobu a určení cíle pro léčivo („disease target“). K určení a především k selekci vhodného cíle se v dnešní době například hojně využívá metod bioinformatiky tzv. „data mining“. Druhým krokem je tzv. „hit identification“, tedy získat sloučeniny, které interagují s naším cílem. K určení „hit“ vede několik screeningových testů, ačkoli v dnešní době je asi nejvíce rozšířená metoda vysokoúčinného screeningu (angl. high throughput screening) nebo „fragment screening“. Třetí krok je tzv. „hit to lead“. V tomto kroku se určují sloučeniny, které fungují efektivně a selektivně v buněčné kultuře. Ve čtvrtém kroku tzv. „lead optimization“ se zkoumá, zda daná sloučenina funguje stejně dobře i ve zvířecích modelech. Určuje se farmakokinetika a farmakodynamika (shrnutí v Hughes et al., 2011). Posledním krokem před KT je tzv. „IND (Investigational New Drug) enabling stage“. Cílem je na konci této fáze mít dost podkladů a důkazů o bezpečnosti a účinnosti léčiva při podávání lidským pacientům pro schválení od FDA (v USA) pro vstup do klinického testování.



Obrázek 2, **The Gap**. Schéma znázorňující propast mezi základním výzkumem (Academia) a finančně náročnými klinickými studiemi (Pharma). Mezeru mezi těmito dvěma světy se snaží překlenout obor translační medicína. Jedním z možných řešení je zakládání spin-off firem na základě výsledků základního výzkumu. Přijato od (<http://www.slideshare.net/inosfera/iocb-iocb-tto-fusek-14974629>) - přístup 10.5.2015.

### 1.4. Od molekuly k léku – Klinická fáze

Průběh a výsledky KT revidují a schvalují v jednotlivých státech národní úřady pro registraci léčiv. Ve Spojených státech amerických je to Food and Drug Administration (=FDA). V zemích Evropského

hospodářského prostoru hraje klíčovou roli v revidování a schvalování klinických testů European Medicines Agency (=EMA) ve spolupráci s agenturami jednotlivých členských států. V České republice je tomu například Státní ústav pro kontrolu léčiv (=SÚKL). Protějšek FDA a EMA například v Japonsku je ‚Pharmaceuticals and Medical Devices Agency‘ (=PMDA), v Číně ‚China Food and Drug Administration‘ (CFDA) a v Jižní Koreji ‚Korean Food and Drug Administration‘ (=KFDA).

KT se provádí na vybrané skupině lidí s cílem zjistit, zda nějaká kandidátní látka bude vykazovat dostatečné léčivé účinky a zároveň nebude mít zraňující efekt v podobě různých vedlejších účinků. Kandidátní látka může být v klinickém testování porovnávána s již existujícím lékem na trhu, nebo s placebem. KT se dělí na tři hlavní fáze (fáze 1, 2 a 3). Aby mohla kandidátní látka vstoupit do klinického testování, musí úspěšně projít preklinickou fází testování na zvířatech. Cílem první fáze klinického testování je určit bezpečnost - nejčastější a nejzávažnější vedlejší účinky se zvyšující se dávkou a získat časný důkaz o účinnosti. Tato fáze je často prováděna na skupině zdravých dobrovolníků typicky o počtu 20-80 účastníků. Kandidátní látka se dostává do druhé fáze, pokud se v první fázi neprokázala nepřijatelná toxicita. Ve druhé fázi je hlavním cílem zjistit účinnost kandidátní látky a to buď porovnáním s odlišným léčivem, nebo s placebem. Stále se monitoruje bezpečnost a krátkodobé vedlejší účinky. Druhé fáze se účastní 20-300 pacientů. Třetí fáze klinického testování začíná tehdy, pokud je potvrzená dostatečná účinnost ve druhé fázi. Třetí fáze je nejdělsí, nejpočetnější a také nejdražší část klinického testování. Může být zaměřená na randomizované skupiny pacientů. Jejich počet se může lišit od několika stovek až po 3000 a více. Cílem této fáze je získat co nejvíce informací o bezpečnosti, účinnosti a možné lékové interakci s dalšími léčivy u různých skupin pacientů. Až po úspěšném projití této fáze může být požádáno u příslušného úřadu o registraci kandidátní látky jako léku. Po všech třech fázích klinického testování nastává ještě postklinická fáze při běžném používání léčiva (někdy nazývána čtvrtá fáze). Jde o sběr informací o lékové bezpečnosti, účinnosti a optimálním použití. Poslední dobou se také sledují možné pozitivní účinky léčiva na jiné nemoci.

## 2. AVP na základě Ig struktury

### 2.1. Motivace

Monoklonální protilátky jsou úspěšně využívány v klinické praxi již po tři desetiletí (první mAb - Muromonab-CD3, 1986, US) a to nejčastěji k léčbě nádorových onemocnění a autoimunitních chorob jako jsou například revmatoidní aritida, Crohnova choroba a ulcerózní kolitida (Walsh, 2014). Ovšem jejich nevýhodou je jejich velikost kolem 155 kDa. To z nich činí molekuly, které omezeně pronikají tkáněmi a nejsou schopny se dostat k některým epitopům. Jako možné řešení se ukázalo použití protilátkových antigen-vazebných fragmentů vytvořených pomocí metod genového inženýrství různou kombinací variabilních domén. Fabs (vel. ~ 50 kDa) jsou nejdéle vyvíjené a již tři byly schváleny jako terapeutika (Abciximab, Ranibizumab a Certolizumab pegol) různých chorob, ale ne nádorových (Walsh, 2014). Nicméně v současné době je největší pozornost směřována k tzv. ‚druhé generaci‘

jednořetězcových variabilních fragmentů (dále scFvs, z angl. single-chain variable fragment) a k tzv. „třetí generaci“ protilátkových vazebných fragmentů (více níže). Protilátkové inženýrství je velmi obsáhlá a rostoucí oblast výzkumu, kterou shrnují dvě rešerše (Nelson, 2010) a (Cuesta et al., 2010). V následujících podkapitolách pouze stručně nastíním danou problematiku na několika příkladech.

Vazebné fragmenty na základě struktury Fc (vel. ~ 60 kDa), monomerního Fc (~ 27 kDa), CH2 (~ 14 kDa) a monomerního CH3 (~ 14 kDa) jsou také vyvíjeny. Výhoda těchto struktur je, že je zachována vazba k Fc receptorům a tím dosaženo vysokého poločasu života využitím recyklačních procesů zprostředkovaných neonatálním Fc receptorem. Vazebná místa jsou různá. Na Fc bylo vytvořeno úpravou smyček na C konci. U monomerního Fc je například možné transplantování CDR a CH2 obsahuje tři smyčky podobné CDR. Jejich špatné vlastnosti jako je stabilita a náchylnost k agregaci je zatím drží mimo potenciální terapeutické využití (shrnuť v Ying et al., 2014).

## 2.2. Jednořetězcové variabilní fragmenty

ScFv je fúzní protein složený z variabilní domény těžkého a lehkého řetězce klasické IgG protilátky, které jsou spojeny krátkým peptidovým linkerem. Jeho velikost je kolem 26 kDa (Bird et al., 1988). Postupem času vznikaly různé modifikace scFv. Například spojení dvou scFv pomocí krátkého peptidového linkeru (~ 5 AA), který zabraňoval sbalení domén stejného řetězce, dalo vzniknout bivalentním molekulám s vyšší aviditou oproti scFv známým jako diabodies (vel. ~ 55 kDa) (Holliger et al., 1993). Dále také pomocí použití kratších linkerů byly vytvořeny tribodies a tetrabodies vykazující vyšší vazebnou aviditu než diabodies (Le Gall et al., 1999). Tyto a další objevy vedly k vývoji terapeutik pod komerčními názvy BiTE a TandAbs.

### 2.2.1. BiTE

BiTE, z angl. Bispecific T cell Engager, jsou rekombinantní molekuly vytvořené z variabilních domén mAbs spojených flexibilním linkerem. Jejich velikost je přibližně 55 kDa. Jedna doména specificky cílí CD3 na povrchu T buněk a druhá doména může specificky vázat antigen na nádorových buňkách. BiTE navázaný na nádorové buňce je rozpoznán cytotoxickým T lymfocitem. To vede k jeho aktivaci a ke vzniku imunologické synapse a následné destrukci nádorové buňky (shrnuť v Frankel a Baeuerle, 2013). V červnu 2014 byl schválen CD19/CD3-bispecifický BiTE pod názvem blinatumomab pro léčbu akutní lymfoblastické leukémie (FDA, 2014). V současné době jsou tři BiTE molekuly proti solidním nádorům v klinickém testování: anti EPCAM x CD3 solitomab (NCT00635596), anti CEACAM5 (carcinoembryonic antigen; CD66e) x CD3 BiTE (NCT01284231), anti FOLH1 (prostate specific membrane antigen) x CD3 BiTE (NCT01723475). (Internetové stránky technologie BiTE společnosti Amgen: [www.biteantibodies.com](http://www.biteantibodies.com))

### 2.2.2. TandAbs

TandAbs, neboli tandem diabodies, jsou bispecifické molekuly vytvořené z protilátkových variabilních domén. Jejich velikost je kolem 110 kDa. V klinickém testování se nachází dvě molekuly TandAbs. TandAb určený k léčbě Hodgkinových lymfomů vstoupil do druhé fáze klinického testování pod názvem AFM13 ([NCT02321592](#)). AFM13 cílí CD30 na nádorových buňkách a CD16A na NK buňkách. Mechanismus protinádorového účinku je zprostředkován přes aktivaci NK buněk ([Reusch et al., 2014](#)). Druhým zástupcem v klinickém testování je AFM11 ([NCT02106091](#)), který cílí CD19 na nádorových buňkách a CD3 na T buňkách. Mechanismus protinádorového účinku je zprostředkován přes aktivaci T buněk. AFM11 je určen pro léčbu Nehodgkinových lymfomů a akutní lymfoblastické leukémie ([Reusch et al., 2013](#)).

(Internetové stránky společnosti Affimed vyvíjející TandAbs: <http://www.affimed.com/index.php>)

### 2.3. ‚Třetí generace‘ protilátkových vazebných fragmentů

V době, kdy byly první antigen specifické protilátkové fragmenty úspěšně selektovány pomocí technologie fágových displejů, došlo k náhodnému objevu unikátní třídy IgG protilátek u velbloudovitých ([Hamerscasterman et al., 1993](#)). Bylo zjištěno, že tyto protilátky HCAs (z angl. heavy chain-only antibodies) zcela postrádají lehký řetězec a první konstantní doménu. Jejich struktura obsahuje Fc část složenou ze čtyř konstantních domén (2xCH2 a 2xCH3) a antigen vázající variabilní N-koncovou doménu označovanou jako VHH. Jejich velikost je typicky kolem 90 kDa. Protilátky postrádající lehké řetězce byly také objeveny u žraloků (*Orectolobus maculatus* a *Ginglymostoma cirratum*) a chiméry (*Hydrolagus colliei*). Tyto protilátky označovány jako Ig-NAR (z angl. immunoglobulin New Antigen Receptor) se skládají se ze dvou stejných řetězců. Každý řetězec obsahuje pět konstantních domén a na N-konci antigen vázající variabilní doménu. Pokud hovoříme o Nanobodies, hovoříme pouze o velbloudovitých rekombinantních VHH, které jsou vyvíjené společností Ablynx („Ablynx,” n.d.). Jako nádorová terapeutika jsou vyvíjeny Nanobodies cílící MET (receptor pro růstový faktor hepatocytů) ([Slørdahl et al., 2013](#)) a ([Denayer et al., 2013](#)). Problematiku Nanobodies, které se v této práci více nebudu věnovat, velmi obsáhle popisují dvě nedávné rešerše ([Hassanzadeh-Ghassabeh et al., 2013](#)) a ([Muyldermans, 2013](#)).

### 3. AVP na základě ne-Ig struktury

„Success in designing proteins with strong binding capacities, much like good fortune in poker, depends on knowing how to fold 'em and how to hold 'em“ (Jeong et al., 2005).

#### 3.1. Motivace

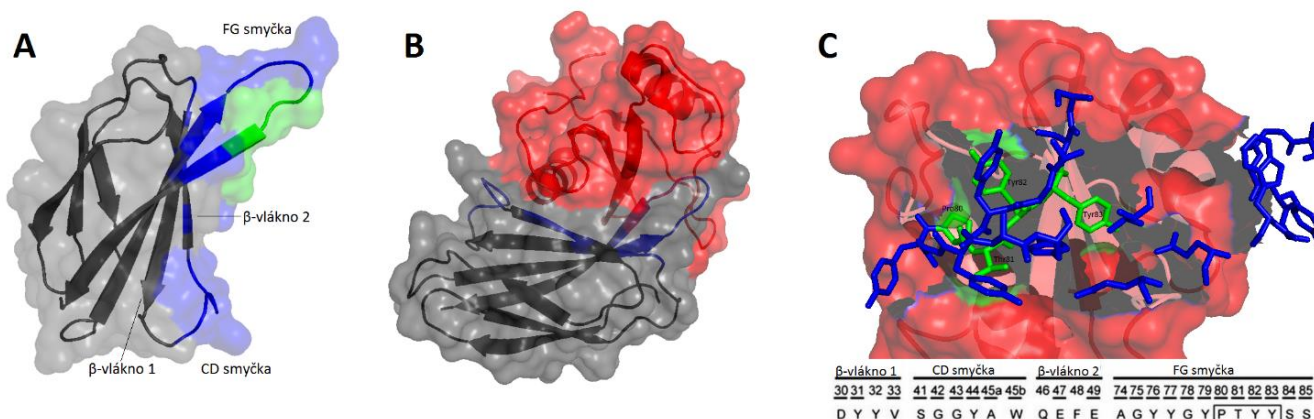
I přes částečný úspěch rekombinantních protilátek nebo jejich fragmentů v klinické praxi jsou patrné nevýhody imunoglobulinové struktury omezující jejich léčebné využití. Mezi tyto nedostatky patří komplikovaná protilátková struktura, velká velikost, složitý racionální návrh, omezená a nákladná produkce v eukaryotních expresních systémech, sklon k agregaci, časově a finančně náročné mutagenní a selekční systémy, toxicita, imunogenicita a v neposlední řadě omezení k duševnímu vlastnictví. Tyto nevýhody protilátkové struktury postavily před vědce otázku, zda by nebylo možné využít k tvorbě vazebných molekul proteiny nepříbuzné s imunoglobuliny. Myšlenka tkvěla v nalezení proteinové struktury, u které by bylo možné upravit část sekvence na vazebnou sekvenci bez zásadního vlivu na její stabilitu. Do současné doby bylo popsáno zhruba 60-70 těchto struktur (viz. příloha na konci dokumentu). Nicméně pouze několik z nich bylo po svém objevu dále vyvíjeno a na tyto struktury se zaměřím v následující kapitole. Jejich původ je z větší části lidský, ale jsou zastoupeny i struktury původem bakteriálním, archeálním, rostlinným, zvířecím a nově byla uměle vytvořena v přírodě se nevyskytující struktura. Hlavní očekávání od AVP jsou zvýšená terapeutická účinnost, bezpečnost, žádná imunogenicita a nižší náklady na výrobu.

#### 3.2. AVP v preklinické/klinické fázi cílící nádorové biomarkery

V této podkapitole shrnu a popíšu všechny AVP vyvíjené jako nádorová terapeutika, které dosáhly minimálně preklinické fáze. Struktury byly ve většině případů objeveny ve vědeckých pracovištích a na základě těchto výsledků byly založeny firmy s cílem dále vyvíjet a především komercializovat objevy základního výzkumu (webové stránky těchto firem uvádím na konci jednotlivých podkapitol). Některé tyto firmy byly koupeny nadnárodními farmaceutickými společnostmi, např. Bristol-Myers Squibb získal Adnexus Therapeutics vyvíjející AVP Adnectin (“Bristol-Myers to acquire Adnexus Therapeutics,” 2007).

### 3.2.1. Adnectin (=monobody)

AVP Adnectin jsou tvořeny na základě struktury lidského glykoproteinu fibronectinu a to konkrétně na jeho desáté extracelulární doméně typu III (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3). Její velikost je kolem 10 kDa a její sendvičová struktura, nezávislá na disulfidických můstcích, je složena ze dvou antiparalelních β-listů se smyčkami na každém pólu domény (obr. 3.A). Absence disulfidických můstků je výhodná pro vytváření proteinů v bakteriálních expresních systémech. Nová vazebná místa jsou vytvářena na smyčkách, která se strukturně podobají protilátkovým CDR. K selekci AVP Adnectin byly použity nejrůznější technologie displejů (mRNA, fágové a kvasinkové) a byly selektovány molekuly s pikomolární K<sub>D</sub> pro různé cíle (shrnuto v Lipovšek, 2011). Adnectin CT-322 cílí receptor 2 pro vaskulární endoteliální růstový faktor (dále VEGFR-2) dosáhl druhé fáze klinického testování a doposud je na poli nádorových terapeutik nejúspěšnějším AVP (viz. kap. 4.2.).



Obrázek 3 **Krystalové struktury Adnectin NSa1 molekuly (A) a komplexu NSa1/N-SH2 domény (B,C).** (A) NSa1 molekula s modře zvýrazněnými úseky, které byli randomizované v knihovně a se zeleně zvýrazněnými úseky, které se vážou do peptid-vazebného místa N-SH2. (B) Komplex NSa1 (šedočerně s výrazněnými úseky jako v A) a N-SH2 (červeně). (C) Detail vazby komplexu NSa1/N-SH2 reprezentující randomizované AK NSa1 (modře a zeleně, jako v A) Sekvence pod-podtrženě randomizované AK, v rámečku AK vázající se do peptid-vazebného místa N-SH2, sekvence přijata od (Sha et al., 2013). Vizualizace vytvořena v programu Pymol na základě Protein Data Bank (PDB) ID kódu 4JE4.

Mimo AVP Adnectin s vazebným místem na smyčkách byl také selektován Adnectin s netradičním vazebným místem vytvořeným z protilehlých smyček a dvou β-vláken tvořící konkávní povrch (obr. 3) (Koide et al., 2012). Tyto Adnectiny byly selektovány se specifickou afinitou pro N- a C-koncové SH2 domény obsahující protein fosfatázy 2 (SHP2). SHP2 je intracelulární cíl, který je důležitý pro signalizaci BCR-ABL tyrozin kinázy, která je příčinou vzniku chronické myeloidní leukemie. Mechanismus působení SHP2 vůči BCR-ABL tyrozin kináze není zcela objasněn a proto ho zde ani nebudu uvádět (Sha et al., 2013).

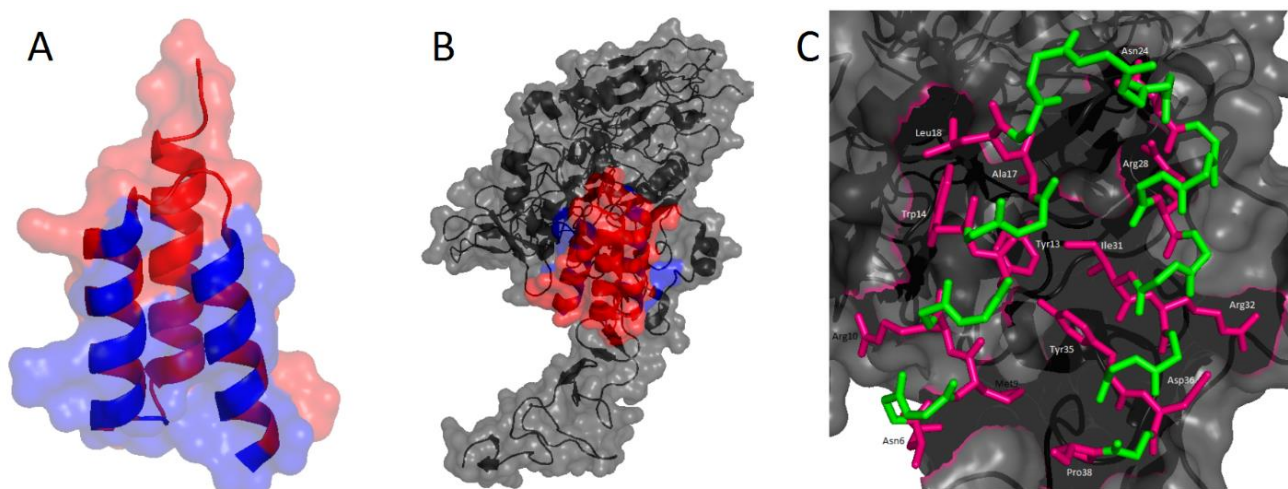


### 3.2.2. Affibody

Strukturu AVP Affibody tvoří  $\alpha$ -helikální Z doména vytvořená z receptorové B domény proteinu A ze *Staphylococcus aureus* (Nilsson et al., 1987). Struktura Affibody proteinu je tvořena svazkem tří  $\alpha$ -helixů, velikost je kolem 6 kDa a stabilita není závislá na intramolekulárních disulfidických můstcích (obr. 4.A). Z prvních vytvořených knihoven byly selektovány technologií fágového displeje Affibody molekuly s mikromolárními  $K_D$  pro různé cíle (Nord et al., 1997).

Affibody molekuly jsou již využívány v biotechnologických aplikacích. Jako nádorová diagnostika jsou v klinickém testování. Affibody cílící nádorový biomarker receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor (HER2) s pikomolární  $K_D$  je vyvíjeno pro specifickou nádorovou radioterapii a nachází se v preklinické fázi výzkumu. Cílená radioterapie je vhodná pro léčbu rozšířeného nádorového onemocnění. Výhodou oproti cílené radioterapii pomocí protilátek je vyšší krevní clearance a rychlejší pronikání k nádorům a prostup nádorovou tkání. Nicméně, malá velikost Affibody molekul má za následek vysokou akumulaci radionuklidů v ledvinách. Možné řešení tohoto problému může být fúze Affibody molekul s albumin-vazebnou doménou (Tolmachev et al., 2007) a nebo konjugace s chelátory mercaptoacetyl-glycyl-glycyl-glycyl nebo s mercaptoacetyl-glycyl-seryl-glycyl (Orlova et al., 2010).

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), HER2, HER3 a HER4 patří do EGFR rodiny. Jejich nadprodukce (nejčastěji HER2) je spojená s nejrůznějšími druhy rakoviny. Signalizace přes tyto receptory je spouštěná ligandem aktivovanou homo- nebo heterodimerizací s některým členem této rodiny. Tyto signální dráhy mohou vést k buněčné migraci, proliferaci, angiogenezi a rezistenci vůči apoptóze. Navíc nadprodukce těchto receptorů v nádorech je spojována s rezistencí vůči chemo- a radioterapii. Z těchto důvodů jsou tyto receptory zkoumané jako vhodné nádorové terapeutické cíle (Marmor et al., 2004).



Obrázek 4 **Krystalové struktury Affibody ZHER2 molekuly (A) a komplexu ZHER2/HER2 (B,C).** (A) ZHER2 molekula s modře zvýrazněnými úseky interagujícími s extracelulární doménou HER2. (B) ZHER2 (červeně a modře zvýrazněné, jako v A) navázaná na rozhraní III. a IV. subdomény HER2 (šedočerně). (C) Detail vazby ZHER2 s různově zvýrazněnými vazebnými AK a zeleně zvýrazněná kostra hlavního řetězce. Vizualizace vytvořená v programu Pymol na základě PDB ID 3MZW.

Další potenciální nádorové terapeutikum bylo vytvořeno spojením Affibody molekuly specificky cílící HER2 s affitoxinem. Affitoxin je modifikovaný exotoxin A z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Po navázání Affibody na HER2 je affitoxin internalizován a v cytosolu blokuje proteosyntézu nádorové buňky (Zielinski et al., 2011).

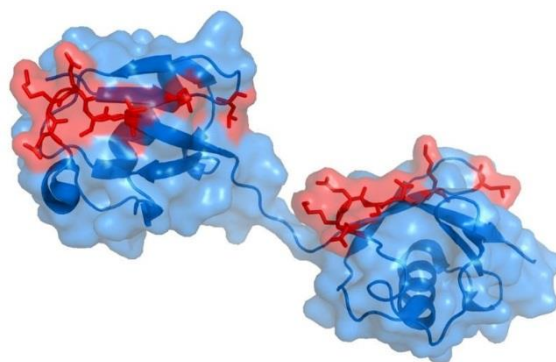
Kromě těchto HER2 cílících molekul byla izolována Affibody molekula cílící HER3 s pikomolární  $K_D$ , která působí jako kompetitivní inhibitor jeho ligandu heregulinu a inhibuje tak buněčnou proliferaci (Malm et al., 2013). Dále také byly vytvořeny bispecifické dimery Affibody molekul cílící současně EGFR a HER2, které blokují jejich dimerizaci, která je důležitá pro jejich aktivaci (Ekerljung et al., 2012). Podobně například inhibuje dimerizaci HER2 a HER3 bispecifický DARPin MP0274 (viz.kap. 3.2.5.).

<http://www.affibody.com>

### 3.2.3. Affilin

Poprvé byl jako strukturní protein pro tvorbu AVP Affilin použit lidský  $\gamma$ -B-crystallin (Ebersbach et al., 2007). Později bylo využito ubiquitinu (Hoffmann et al., 2012). Lidský  $\gamma$ -B-crystallin je kolem 20 kDa velký protein se strukturou tvořenou ze dvou domén, jejichž stabilita je nezávislá na intramolekulárních disulfidických můstcích. Každá doména je složena ze dvou motivů řeckého klíče.  $\gamma$ -B-crystallin vykazuje vysokou stabilitu a je považován za jeden z proteinů s nejdélsí životností. Pomocí technologie fágových displejů byly vyselektovány Affilin molekuly s nanomolární  $K_D$  pro různé cíle. Jedná se o jedno z prvních popsanych přístupů vytvoření *de novo* vazebného místa na strukturním proteinu tvořeného z  $\beta$ -listů (Ebersbach et al., 2007).

Ubiquitin je protein velký kolem 8,5 kDa s vysoce kompaktní  $\alpha/\beta$  strukturou a s výbornými biochemickými a biofyzikálními vlastnostmi. K vytvoření nového vazebného místa bylo použito existující vazebné místo pro ubiquitin-vazebnou doménu. Technologií ribosomálního displeje byly z knihovny vyselektovány Affilin molekuly cílící TNF- $\alpha$  s nanomolární  $K_D$ . Inhibitory TNF- $\alpha$  jsou potenciální terapeutika pro zánětlivé choroby, které nejsou tématem této práce (Hoffmann et al., 2012). Později byl vyselektován Affilin cílící extradoménu B fibronectinu (ED-B). ED-B je považována za dobrý nádorový



Obrázek 5 **Dimer ubiquitinu**. Ubiquitinový scaffold s červeně zvýrazněnými AK pozicemi, které byly použité pro tvorbu knihoven. Na obrázku původní postranní řetězce ubiquitinu. Přijato od (Lorey et al., 2014).

biomarker, protože se vyskytuje v těle pouze při hojení ran, zánětech a ve většině nádorových tkání. Knihovna pro selekci Affilin molekul byla vytvořena z dimerů ubiquitinu a na každém monomeru bylo vytvořeno jedno vazebné místo (obr. 5). Selekcce molekul cílících ED-B byla provedena ve dvou krocích. V prvním kroku byla využita technologie fágového displeje a v druhém kroku byla provedena *in vitro*



afinitní maturace pomocí technologie ribosomálního displeje. Takto byly vyselektovány molekuly s pikomolární  $K_D$  pro ED-B. S cílem prodloužit poločas života selektovaných molekul byly použity tři metody – PEGylace, Fc fúze a MSA fúze (Lorey et al., 2014). Další vyselektované AVP cílicí ED-B jsou například Anticalin a Fynomer.

Společnost Scil Proteins v roce 2011 oznámila snahu o dosažení první fáze klinických testů do tří let (“GEN | News Highlights,” n.d.). Nicméně doposud se žádné potenciální Affilin terapeutikum v klinickém testování nenachází.

<http://www.scilproteins.com/>

### 3.2.4. Anticalin

AVP Anticalin jsou tvořeny na základě struktur členů proteinové rodiny lipokalinů. Doposud bylo nalezeno 12 tříd lidských lipokalinů, které se vyskytují v krevní plazmě a tělních tekutinách a přirozeně vážou, skladují a transportují různé molekuly. Jejich struktura je tvořena konzervovanou rigidní kostrou z  $\beta$ -soudku a čtyřmi variabilními smyčkami. Jejich velikost je kolem 20 kDa. Nejvíce využívané lipokaliny pro tvorbu AVP jsou tyto čtyři – bilin vazebný protein (BBP) z *Pieris brassicae*, lidský apolipoprotein D, lidský lipocalin 1 (Lcn1), také znám jako tear lipocalin (Tlc), a lidský lipocalin 2 (Lcn2), také znám jako neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) (shrnutí v Richter et al., 2014).

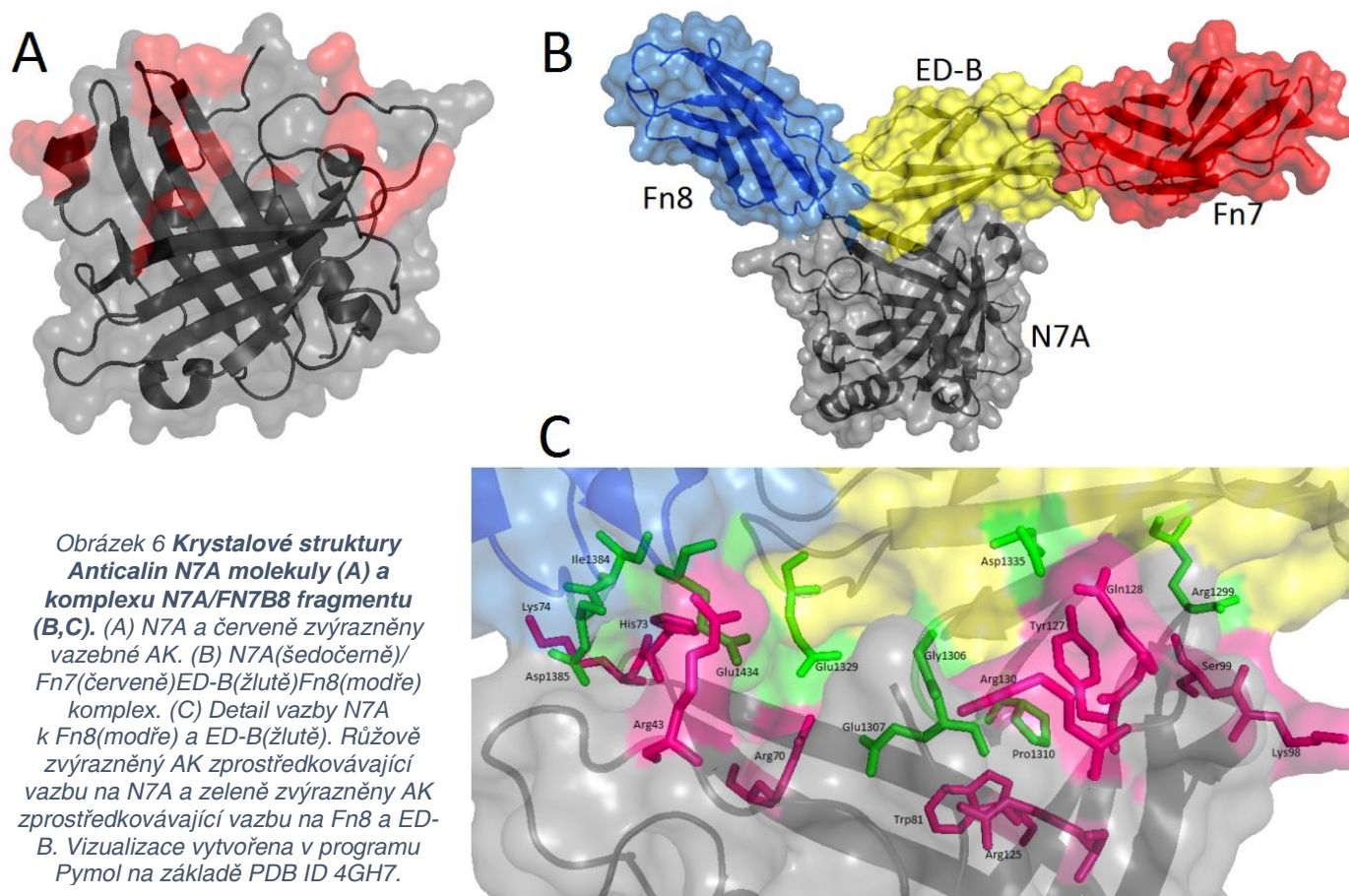
K vytvoření prvního Anticalinu, který specificky cílil fluorescein, byl jako strukturní protein použit BBP (Beste et al., 1999). Doposud nejpokročilejší Anticalin na poli nádorových terapeutik je AVP PRS-050 na základě struktury Lcn1 cílicí vaskulární endoteliální růstový faktor (dále VEGF), který úspěšně prošel první fází klinického testování. Nicméně společnost Pieris se rozhodla nepokračovat v dalších fázích (viz kap. 4.3.) (Mross et al., 2013). V preklinickém vývoji nádorových terapeutik se nachází dva AVP Anticalin. První cílicí CTLA4 (z angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) (Schönfeld et al., 2009) a druhý cílicí MET (Olwill et al., 2013).

Pro vývoj Anticalin molekul specificky cílicích CTLA4 slouží jako strukturní protein lidský lipocalin Lcn2. Ve studii publikované roku 2009 (Schönfeld et al., 2009) je popsána selekce Anticalin molekul se subnanomolární  $K_D$  pro CTLA4 pomocí technologie fágového displeje. Nicméně dá se předpokládat, že od té doby došlo k vylepšení postupu přípravy a vlastností izolovaných molekul, které nejspíše z komerčních důvodů nebyly publikovány.

Další v preklinické studii vyvíjena molekula Anticalin (PRS-110) cílicí MET je selektována z knihovny vytvořené z lipokalinu Lcn1. Ligandem pro MET je HGF (růstový faktor hepatocytů), který aktivuje signální dráhy vedoucí k proliferaci, migraci a spouští signály přežití důležité v nádorovém vývoji. Kromě aktivace ligandem může být signální dráha aktivována i jinými způsoby na ligandu nezávislých. Důležité je, že PRS-110 je zřejmě schopen inhibice obou způsobů aktivace signální dráhy. *In vivo* experimenty ukázaly slibnou protinádorovou účinnost PRS-110. Tyto výsledky staví PRS-110 do pozice potenciálního kandidáta na KT (Olwill et al., 2013).

Dále byl také publikován objev Anticalin molekuly vytvořené ze struktury Lcn2 (obr. 6) cílící ED-B. Pomocí technologie fágového displeje byly vyselektovány molekuly s nanomolární  $K_D$  pro ED-B (Gebauer et al., 2013).

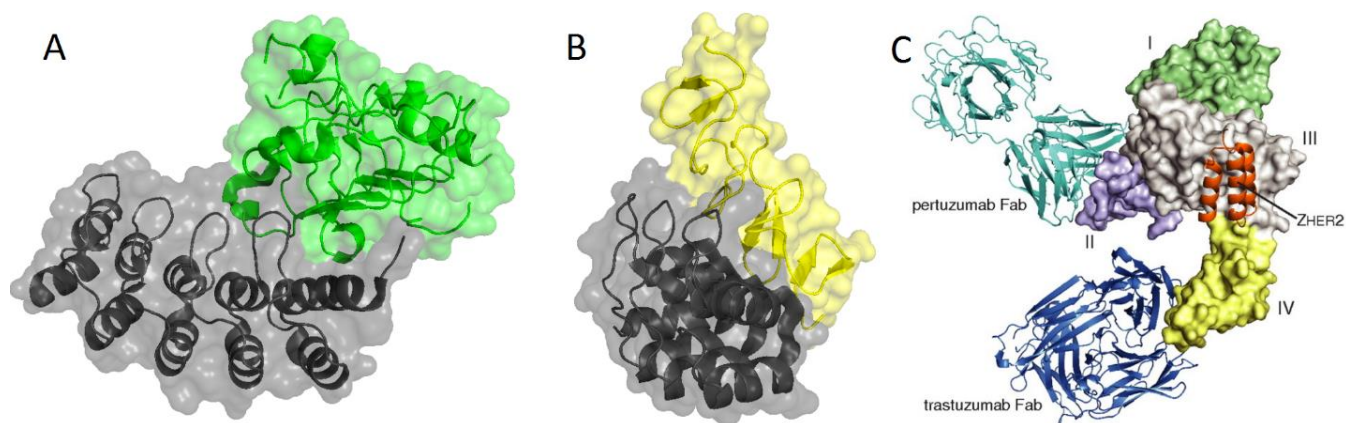
<http://www.pieris.com/>



### 3.2.5. DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins)

AVP DARPins jsou vytvořeny na základě struktury opakujícího se ankyrinového motivu. Ankyrinový motiv se obvykle skládá z 33 AK, které tvoří strukturální jednotku obsahující  $\beta$ -vlásečku a dva antiparalelní  $\alpha$ -helixy. Proteinové domény ankyrinu obvykle obsahují 4-6 těchto opakování (14-20 kDa) (obr. 7.A,B). Jednotlivé domény se mohou snadno spojovat a tvořit multi-DARPins, které se mohou vázat na více cílů. DARPins jsou velmi pokročilé AVP, u kterých byly popsány různé selekční technologie, modifikace struktury a široká šíře využití. Toto a více popisuje nejnovější rešerše od jejich objevitele A.Plueckthuna (Plueckthun, 2015). Nejpokročilejší DARPins na poli nádorových terapeutik je MP0250 cílící VEGF a HGF v první fázi klinického testování (viz. kap. 4.4.) a MP0274 (více níže) v preklinickém vývoji.

Jednotlivé molekuly DARPins se dají spojit pomocí krátkého linkeru. Ke konstrukci bispecifické molekuly byly použity monospecifické molekuly s rozdílným cílem na HER2 – subdoména I a IV. Bylo zjištěno, že monovalentní DARPins použité k tvorbě bispecifických DARPins jsou biologicky neaktivní bez cytotoxického vlivu. Aktivita bispecifických DARPins je závislá na délce linkeru a orientaci domén. Bispecifický DARPins (MP0274) blokuje HER2 homo- a HER3 hetero-dimerizaci a indukuje HER2 internalizaci. MP0274 v *in vitro* experimentu s buněčnou linií BT474 HER2+ rakoviny prsu vykazovala vyšší cytotoxický efekt než terapeutická protilátka trastuzumab a proto má potenciál dosáhnout klinického testování (Jost et al., 2013) a (“MP0250/MP0274,” n.d.).



Obrázek 7 **Krystalové struktury komplexu DARPin 9.29/I. subdomény HER2 (A) a DARPin G3/IV. subdomény HER2 (B).** (A) DARPin 9.29 (šedočerně) navázaný na subdoménu I HER2 (zeleně). (B) DARPin G3 (šedočerně) navázaný na subdoménu IV HER2 (žlutě). (C) Extracelulární doména HER2 (I.subdoména zeleně, II.subd.fialově, III.subd.šedě, IV.subd.žlutě) s navázanými mAbs (pouze Fab zobrazeny) a Affibody ZHER2 demonstruje odlišná místa vazby DARPins molekul. Vizualizace A a B vytvořena v programu Pymol na základě PDB IDs 4HRL a 4HRN. C přijato od (Eigenbrot et al., 2010).

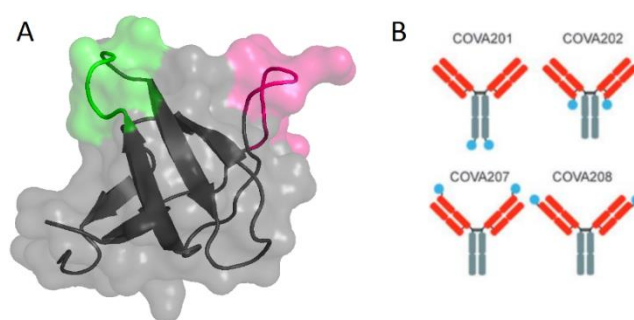
Za zmínku stojí studie popisující specifické cílení nádorů onkolytickým virem spalniček pomocí připojených molekul DARPins. Jejich výhodou oproti současným metodám cílení je snadná příprava bispecifických molekul. Bispecifické cílení oproti monospecifickému je výhodné pro potlačení rezistence nádorových buněk proti cílené terapii způsobenou regulací směrem dolů terapeutického cíle (Friedrich et al., 2013).

<http://www.molecularpartners.com/>

### 3.2.6. Fynomer

AVP Fynomer jsou vytvořeny na základě struktury Fyn SH3 domény, která je evolučně zakonzervovaná mezi člověkem, myší, krysou a gibbonem. Její struktura je nezávislá na disulfidických můstcích a obsahuje dva antiparalelní  $\beta$ -listy a dvě flexibilní smyčky, přes které je zprostředkována interakce s ostatními proteiny (obr. 8.A). Velikost Fynomer molekul je kolem 7 kDa. První izolovaný AVP Fynomer cílil ED-B a byl selektován pomocí technologie fágového displeje (Grabulovski et al., 2007).

Na poli nádorových terapeutik je vyvíjen jeden AVP Fynomer – COVA208, který se nachází na počátku preklinického testování. Ve skutečnosti se jedná o fúzní protein tzv. FynomAb. Jde o fúzi dvou Fynomer C12 molekul a terapeutické protilátky pertuzumab. Fynomer C12 molekuly jsou sloučeny s N konci lehkých řetězců. Ukázalo se, že účinnost vzniklé molekuly je závislá na místě připojení Fynomeru s protilátkou (obr. 8.B). COVA208 cílí dva rozdílné epitopy na HER2 a účinkuje novým způsobem oproti známým terapeutikům cílící HER2. Bylo prokázáno, že sloučením Fynomer molekul s terapeutickými protilátkami může být vylepšená jejich účinnost. Například v *in vitro* a *in vivo* nádorových modelech resistantních vůči konvenčním anti-HER2 protilátkám COVA208 vykazovala silnou protinádorovou účinnost (Brack et al., 2014). FynomAb COVA208 se tedy zdá být potenciálním kandidátem na dosažení klinického testování.



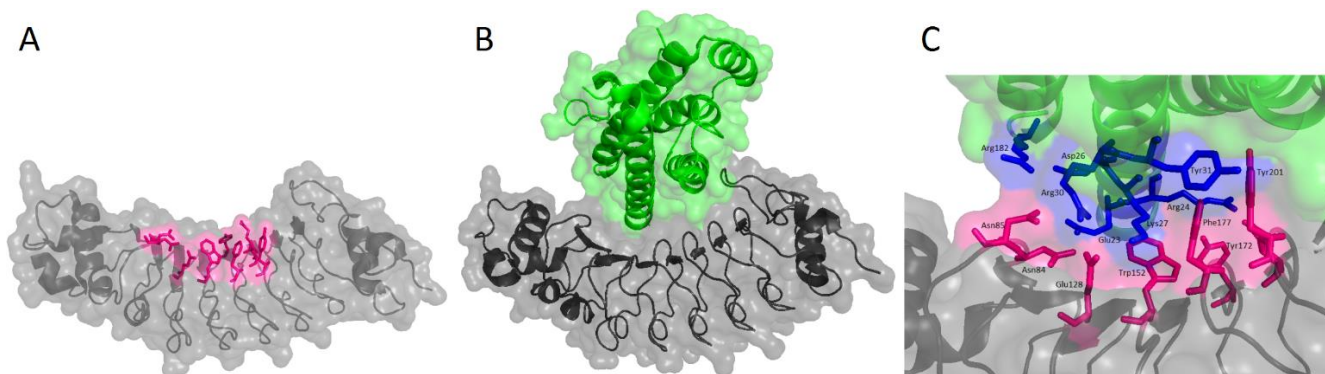
Obrázek 8 (A) Krystalová struktura Fyn SH3 domény se zvýrazněnými smyčkami pro tvorbu knihoven – RT smyčka (růžově) a src smyčka (zeleně). Vytvořeno v programu Pymol na základě PDB ID 1M27. (B) Anti-HER2 protilátky (červeně + šedě) s různě navázanými Fynomery (modře). Přijato od (Brack et al., 2014).

<http://covagen.com/>

### 3.2.7. Repebody

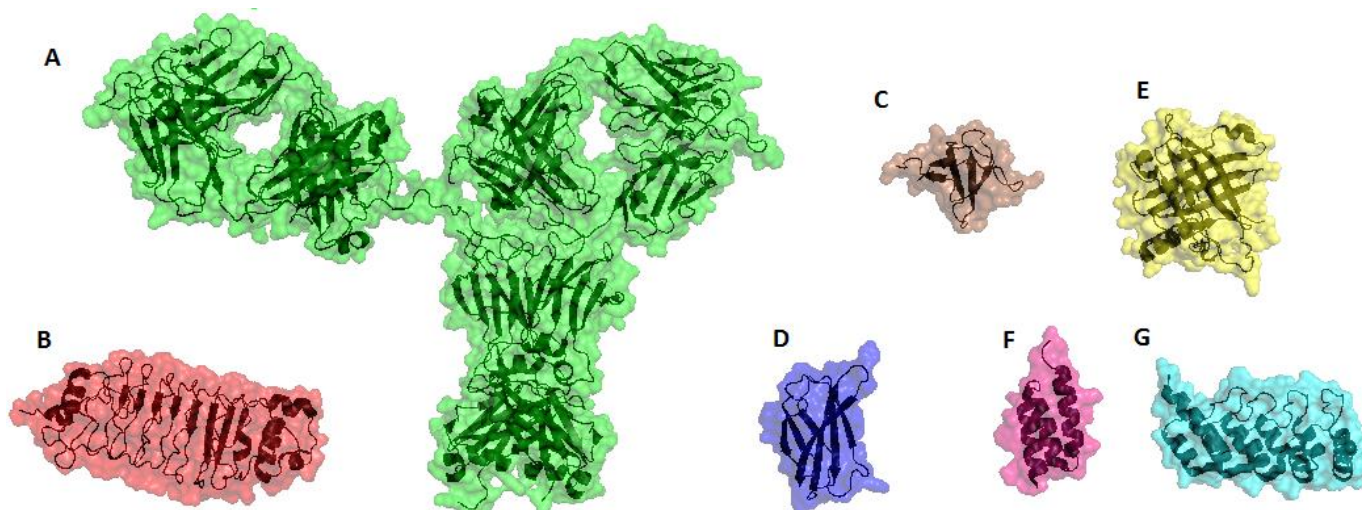
Repebody jsou vytvořeny na základě struktury variabilního lymfocytového receptoru (VLR). VLR zastává roli protilátek ve specifické imunitní odpovědi u mihulí a sliznatek. Struktura VLR vykazuje modulární architekturu tvořenou z repetitivních bohatých na leucin. S cílem získat vysokou míru exprese rozpustného proteinu v bakteriálních expresních systémech byla N koncová doména nahrazena čepičkou internalinu-B. Výhoda Repebody a obecně repetitivních proteinů oproti globulárním proteinům leží v možnosti modulárního designu. Tedy možnosti přidávat a ubírat jednotlivé moduly dle potřeby bez rozrušení celkové struktury (Lee et al., 2012).





Obrázek 9 **Krystalové struktury Repebody D3E8 molekuly (r-D3E8) (A) a komplexu r-D3E8/IL6 (B,C).** (A) R-D3E8 s růžově zvýrazněným vazebným místem. (B) Komplex r-D3E8 (šedočerné) a lidského IL6 (zeleně). (C) Detail vazebného místa komplexu r-D3E8/IL6. Růžově zvýrazněny vazebné AK na r-D3E8(šedočerně) a modře zvýrazněny vazebné AK na IL6 (zeleně). Vizualizace vytvořena v programu Pymol na základě PDB ID 4J4L.

V současné době je v preklinickém vývoji molekula Repebody cílicí interleukin-6 (IL-6) s  $K_D$  v pikomolární šíři. Vysoká afinita byla dosažena afinitní maturací založené na modulární strategii. Jedna z rolí IL-6 je aktivace transkripčního faktoru STAT3. Nadprodukce IL-6 a následná zvýšená aktivace STAT3 hraje významnou roli v rozvoji zánětlivých a nádorových onemocnění. Proto je IL-6 považován za slibný cíl pro nádorovou terapii. Blokáce IL-6/STAT3 signální dráhy Repebody molekulou vedla k potlačení růstu lidského xenotransplantátu nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC z angl. non-small-cell-lung cancer) u myší. Studie mAbs cílicí IL-6 ukázaly, že protilátka tvoří s IL-6 velký stabilní komplex, který zůstává v séru, což může později způsobovat agonistický efekt. Toto se nezdá být u malé Repebody problémem, což může být jednou z budoucích výhod (Lee et al., 2014).



Obrázek 10 **Velikostní porovnání struktur.** (A) IgG ~ 155 kDa, 1344 AK; (B) Repebody ~ 29 kDa, 267 AK; (C) Fynomer ~ 7 kDa, 63 AK; (D) Adnectin ~ 10 kDa, 94 AK; (E) Anticalin ~ 20 kDa, 188 AK; (F) Affibody ~ 6 kDa, 58 AK; (G) DARPins ~ 17 kDa, 171 AK. Vizualizace A-G vytvořena v programu Pymol na základě PDB ID (ve stejném pořadí) – 1HZH, 4J4L, 1M27, 4JE4, 4GH7, 3MZW a 4HRL.

### 3.3. Ostatní pokročilé AVP

**Adhiron:** AVP Adhiron jsou vytvořeny na základě struktury konsenzuální sekvence rostlinného proteinu phytocystatinu, obsahující čtyři antiparalerní  $\beta$ -listy s centrálně umístěným  $\alpha$ -helixem. Phytocystatin je inhibitor rostlinných proteáz o průměrně velikosti 100 AK a jeho strukturní stabilita je nezávislá na disulfidických můstcích (Tiede et al., 2014).

<http://www.fbs.leeds.ac.uk/staff/profile.php?un=bmb6mjm>

**Affimer:** AVP Affimer jsou vytvořeny na základě struktury lidského proteázového inhibitoru Stefin A, který stejně jako phytocystatin (viz. nad) patří do cystatinové strukturní rodiny (čtyři antiparalerní  $\beta$ -listy s centrálně umístěným  $\alpha$ -helixem) ("Affimers," n.d.). Stefin A je 11 kDa velký a jeho strukturní stabilita je nezávislá na disulfidických můstcích. V současné době jsou Affimer vyvíjeny jako potenciální bioléčiva společností Promexus ("Promexus," n.d.).

**Albumin vazebná doména:** Již delší dobu se fúze s albumin vazebnou doménou využívá k prodloužení poločasu života v plazmě, například u Affibody (Tolmachev et al., 2007). Nicméně v tomto případě byla struktura albumin vazebné domény (získána ze streptokokálního Proteinu G) využita k tvorbě AVP. Její  $\alpha$ -helikální struktura připomínající strukturu Affibody je tvořena pouze z 46-ti AK a neobsahuje disulfidické můstky. Ve struktuře bylo vytvořeno nové vazebné místo pro HER3 a zároveň na opačné straně zachováno vazebné místo pro albumin. Tím byla vytvořena velmi malá molekula specificky cílící terapeutický cíl s nanomolární  $K_D$  s dostatečně dlouhým poločasem života v plazmě bez nutnosti použít metodu pro jeho prodloužení (Nilvebrant et al., 2013).

**Alphabody:** Alphabody jsou vytvořené na základě zcela nové v přírodě se nevyskytující struktury. Tato struktura, která byla vyvinuta *in silico* vykazuje trojitou  $\alpha$ -helikální coiled coil strukturu o velikosti mezi 8 a 14 kDa (Desmet et al., 2010). Vývoj Alphabody terapeutik je soustředěn do oblastí autoimunitních onemocnění a rakoviny ("Complix – Therapeutic focus," n.d.). Na poli autoimunitních terapeutik je v preklinickém vývoji molekula cílící IL-23 (Desmet et al., 2014). Alphabody jsou výjimečné především vývojem molekul, které jsou schopné prostoupit buněčnou membránou a specificky vázat a inhibovat intracelulární cíle (Lasters et al., 2014). Příkladem je v preklinickém vývoji potenciální onkologické Alphabody terapeutikum, které cílí intracelulární protein MCL1 (z angl. myeloid cell leukemia 1). MCL1 bývá často nadprodukován v nádorových buňkách, které chrání před apoptózou ("Complix – Therapeutic focus," n.d.).

**Atrimer:** Atrimer byly vytvořeny na základě struktury lidského tetranectinu. Tetranectin je homotrimerní protein o přibližné velikosti 60 kDa, který se přes jeho smyčkové regiony přirozeně váže na plasminogen a fibrin. Byly vyselektovány Atrimer molekuly specificky cílící TNFRSF10A (death receptor 4, DR4), což

vede k indukci apoptózy nádorových buněk (Allen et al., 2012). Nicméně v současné době se zdá být jejich vývoj z finančních důvodů přerušen.

**Avimer:** AVP Avimer byly vytvořeny na základě struktury receptorových A-domén. A-domény tvoří poměrně velkou rodinu extracelulárních receptorových domén - cca 217 lidských A-domén. Velikost jednotlivých domén je zhruba 4 kDa a jsou dohromady pospojovány krátkými linkery ( $\approx 5$  AK). A domény přirozeně vážou přes více než 100 známých cílů. Jednotlivé domény se vážou na různé epitopy daného cíle a tím vzniká tzv. efekt avidity, který vede ke zvýšení afinity a specifity. Efektu avidity bylo využito i při tvorbě Avimer molekul. Byly izolovány Avimer se subnanomolárními  $K_D$  cílicí terapeutické cíle IL-6, MET, CD28, CD40L a BAFF (Silverman et al., 2005). Nejpokročilejším projektem byl inhibitor IL-6 proti Chronové chorobě C326 (=AMG220), který dosáhl první fáze klinického testování (NCT00353756). Nicméně žádný další vývoj Avimerů nebyl publikován.

**Centyrin:** AVP Centyrin je vytvořen na základě struktury FN3 domény (vel.  $\sim 10$  kDa) lidského proteinu Tenascin C (Diem et al., 2014). Struktury FN3 domény je využíváno i v případě AVP Adnectin (viz.kap. 3.2.1.) a Pronectin (viz.níže).

**Knottin:** Knottiny, také známy jako cystin-knot miniproteiny, jsou strukturní rodina o přibližné velikosti 30-50 AK ( $\sim 3$  kDa), vyznačující se konzervovaným jádrem (core) a regiony obsahující smyčky s variabilní délkou. Tyto regiony jsou využívány k vytváření nových vazebných míst. Jádro je klasicky stabilizované třemi pevně "propletenými" disulfidickými můstky. Tato struktura připomíná jakýsi uzel (proto knottins z angl. knot = uzel), který je velmi chemicky, tepelně a proteolyticky odolný. Výjimečná odolnost je řadí mezi kandidáty na terapeutika podávána orální cestou. Jejich C- a N-konec může být někdy propojen a poté tyto molekuly nazýváme cyclotidy (Moore et al., 2012).

Membránové receptory integriny, konkrétně  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , a  $\alpha_5\beta_1$ , jsou ve vysoké míře přítomny na mnoha nádorech. Jejich účinek vede k nádorové proliferaci a migraci, a proto jsou považovány za slibné terapeutické cíle. Byla izolována molekula Knottin, která specificky cílila všechny tři integriny ( $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , a  $\alpha_5\beta_1$ ). Z důvodu přítomnosti disulfidických vazeb byla k selekci s výhodou použita technologie kvasinkových displejů (Kimura et al., 2009). V následující studii byla popsána chemická dimerizace těchto molekul vedoucí k avidity efektu a dosažení  $K_D$  v pikomolární šíři, což mělo za následek vyšší míru inhibice (Kim et al., 2015).

<http://cochranlab.net/research/knottins.shtml>

**Kunitz domain:** Struktura AVP Kunitz domain je typicky založena na lidských inhibitorech serinových proteáz o přibližné velikosti 58 AK. Jejich struktura je stabilizována disulfidickými můstky (shrnuto v Gebauer a Skerra, 2009). Úspěšným příkladem dosažení klinické praxe je ecallantide (obchodní název Kalbitor, vývojový název DX-88) inhibující plazmový kalikrein, jež byl schválen FDA pro léčbu hereditárního angiodemu v roce 2009 ("Dyax," n.d.). Ve vývoji také byla pegylovaná molekula

DX-1000, která specifická cítila a inhibovala plasmin, což je potenciální terapeutický nádorový cíl (Devy et al., 2007). Nicméně se zdá, že její vývoj dále nepokračuje.

**Nanofitin:** AVP Nanofitin jsou vytvořeny na základě struktury DNA-vazebného proteinu Sac7d, který byl izolován z termofilního archeonu *Sulfolobus acidocaldarius*. Protein z tohoto extremofila vykazuje vynikající chemickou a teplotní stabilitu a je odolný vůči extrémním hodnotám pH. Jeho velikost je 7 kDa a jeho struktura je nezávislá na disulfidických můstcích (Mouratou et al., 2007). Vývoj Nanofitin jako terapeutik je především soustředěn do oblastí onemocnění CNS, infekčních, očních a zánětlivých chorob ("Affilogic pipeline," n.d.).

**OBody:** AVP Obody je vytvořen na základě struktury Ob-foldu aspartyl tRNA syntetázy pocházející z termofilního archeonu (obdobně jako Nanofitin) *Pyrobaculum aerophilum*. Struktura je složena z 111 AK, které tvoří pětivláknový  $\beta$ -soudek jehož stabilita je nezávislá na disulfidických můstcích. OBody mají jedinečné vazebné místo tvořené ze čtyř smyček a konkávního  $\beta$ -listu (Steemson et al., 2014).

<http://www.obodies.com/>

**Pronectin:** AVP Pronectin jsou vytvořeny na základě struktury 14-té domény lidského fibronectinu typu 3 ( $^{14}$ Fn3) ("Pronectins," n.d.). Obdobně jako u Adnectin, kde je použita struktura 10-té domény Fn3. Společnost Protelica vyvíjí AVP Pronectin proti několika nádorovým biomarkerům ("Protelica pipeline," n.d.). Nicméně zatím nebyla publikována žádná data a to nejspíše z komerčních důvodů.

## 4. AVP v klinickém testování

Doposud se do klinického testování na poli nádorových terapeutik dostaly tři AVP - CT-322 (Adnectin), PRS-050 (Anticalin) a MP0250 (DARPin). Všechny tři inhibují angiogenezi přes narušení VEGF signálního systému. MP0250 je bispecifický a navíc cílí HGF a tím inhibuje invazivitu a tvorbu metastáz.

### 4.1. Cílená antiangiogenní terapie

Již v roce 1971 byla vydána publikace popisující nezbytný vznik nových krevních kapilár (angiogeneze) pro růst nádorů překračující velikost 2-3 mm. Z tohoto pozorování vzešla myšlenka inhibice angiogeneze s cílem zastavit nádorový růst (Folkman 1971; podle Vasudev a Reynolds, 2014). Hlavním hráčem v angiogenezi se zdá být VEGF-A, který je nadprodukován ve většině solidních nádorů. U savců se celkem vyskytuje pět příbuzných ligandů – VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a placentární růstový faktor (PLGF), který se s různou specifitou váže na tři



receptorové kinázy – VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3. Ligand VEGF-A se váže k VEGFR-1 a s desetkrát menší afinitou k VEGFR-2. Zjednodušeně, signalizace přes VEGFR-1 je významná v angiogenezi při zánětech, ale její role v nádorové angiogenezi je nejasná. Aktivace VEGFR-2 spouští signální dráhy aktivující diferenciaci, proliferaci a migraci endoteliálních buněk vedoucí k angiogenezi, která je nezbytná pro nádorový růst. A signalizace přes VEGFR-3 je esenciální pro vývoj lymfatických endoteliálních buněk (shrnutí v [Tugues et al., 2011](#)). Komplexní a složitou problematiku angiogeneze a její molekulární mechanismy popisuje obsáhlá rešerše ([Carmeliet a Jain, 2011](#)). Schválená terapeutika cílící VEGF signální systém se dají rozdělit do tří skupin:

1. malé molekuly inhibující receptorové kinázy (např. sorafenib, sunitinib a pazopanib),
2. bioléčiva blokující vazbu ligandu na receptory (bevacizumab a aflibercept),
3. bioléčiva blokující signalizaci vazbou na receptor (ramucirumab)

(shrnutí v [Vasudev a Reynolds, 2014](#)).

## 4.2. CT-322

První selekce molekuly z knihovny Adnectinů cílící VEGFR-2 byla popsána v roce 2005. Prvním krokem byla selekce molekul cílící VEGFR-2 z 10Fn3 mRNA fúzní knihovny využitím techniky mRNA displeje. Ze selektovaných klonů byla vybrána molekula VR28 s nejvyšší afinitou (11-13 nM) ke KDR (lidský genový název pro VEGFR-2), nicméně její inhibiční síla byla velmi slabá ( $IC_{50} > 200$  nM). Proto u VR28 byla provedena afinitní maturace s cílem selektovat molekuly s vyšší afinitou. Použitím hypermutagení PCR byly do tří vazebných smyček (BC, DE a FG smyčka) vnášeny mutace. Bylo zjištěno, že nejvíce výhodných mutací vzniká většinou pouze v FG smyčce a také, že delecí prvních 8 AK z N-konce proteinu se zlepšila vazebná afinita ke KDR. Dále, na základě těchto poznatků, byly vytvořeny knihovny s i bez N-koncové delecí a mutace se vnášely pouze do FG smyčky použitím cílené oligonucleotide-derived mutagenese. Nově selektované molekuly vykazovaly afinitu v šíři od 0,32 do 1,8 nM a bylo prokázáno, že delecí N-konce v průměru třikrát zlepšila vazebnou afinitu. V dalších selekcích byly izolovány molekuly cílící jak KDR tak Kdr (myší genový název pro VEGFR-2) s nejvyššími afinitami až kolem 0,06 nM. Což se jeví jako důležitá a podstatná výhoda pro další preklinické studie - stejná molekula může být testována ve zvířecích i lidských modelech. Dále bylo zjištěno, že selektované molekuly nevykazují žádnou značnou afinitu k VEGFR-1 (31% sekvenční identita s VEGFR-2) a jsou specifické vůči VEGFR-2, což je vhodné pro snížení rizika vedlejších účinků u potenciálního léčiva. Nakonec byly vyselektovány molekuly s velmi dobrými hodnotami  $IC_{50}$  v šíři 3-12 nM pro KDR a 2-5 nM pro Kdr, tedy hodnoty porovnatelné s vysokoafinitními anti-VEGFR-2 mAbs ([Getmanova et al., 2006](#)).

V následných preklinických studiích se zkoumala účinnost molekuly CT-322, PEGylovaného adnectinu, na zvířatech. Cílem výzkumu z roku 2008 bylo zjistit na myších ortotopických modelech nádoru pankreatu, zda nový adnectin inhibuje angiogenezi a to zda ovlivní růst nádoru. První model byl vytvořen vnesením štěpu lidských nádorových buněk pankreatu MiaPaCa-2 do ohonu pankreatu nahých myší a druhý model vnesením syngenní nádorové buněčné linie Pan02 do pankreatu C57BL/6J myší. Skupině

prvního modelu byl podáván CT-322, skupině druhého modelu byl navíc aplikováno chemoterapeutikum gemcitabin a nebo kombinace CT-322 a gemcitabinu a u obou modelů byla vytvořena kontrolní skupina bez léčby. Terapie byla podávána dvakrát týdně po dobu šesti týdnů. Studie potvrdila redukční vliv CT-322 na nádorovou angiogenezi a výsledky také ukázaly vcelku efektivní zastavení nádorového růstu - 50% snížení nádorového růstu u prvního modelu ovšem bez snížení počtu metastáz oproti kontrolní skupině a více jak 50% snížení nádorového růstu u kombinace CT-322 a gemcitabinu a snížení počtu metastáz u všech podskupin druhého modelu oproti kontrolní skupině (Dineen et al., 2008). Další preklinické studie s pozitivními výsledky popisuje např. (Mamluk et al., 2010) a (Ackermann et al., 2012).

CT-322 vstoupil do první fáze klinického testování (KT) již v roce 2006. Hlavní cílem této studie bylo určit maximální tolerovatelnou dávku (MTD), bezpečnost, farmakokinetiku, farmakodynamiku, imunogenicitu a předběžnou protinádorovou aktivitu. Do studie bylo vybráno 39 dospělých pacientů se solidními nádory neodpovídající na standardní léčbu nebo bez dostupné léčby. Těmto pacientům byly podávány zvyšující se dávky CT-322 od 0,1 mg/kg do 3,0 mg/kg. Zvýšená koncentrace VEGF-A v plazmě jest je považována za farmakodynamický biomarker, byla po podání CT-322 pozorována u všech pacientů. Proteinurie, zvýšený krevní tlak, únava a nevolnost byly nejčastěji se vyskytující a očekávané vedlejší účinky spojené s léčbou. Ačkoli u většiny pacientů byly identifikovány protilátky proti CT-322, jejich vliv byl v podstatě nulový a bez výskytu vedlejších účinků spojených s protilátkovou odpovědí. Z výsledků bylo určeno optimální dávkování/MTD 2 mg/kg týdně/ob týden. Výsledky dále ukázaly slibnou protinádorovou aktivitu, nicméně zatím bez větší vypovídající hodnoty (Tolcher et al., 2011).

CT-322 blokuje vazbu všech tří ligandů (VEGF-A, VEGF-C a VEGF-D), které aktivují receptor. Tudíž byl nasnadě pokus o její využití u nádorů s nadexprimovaným VEGFR-2 vyvolávající vysokou vaskularizaci, jako je např. nádor mozku glioblastom (dále GBM). Ve druhé fázi KT CT-322 byly provedeny dvě části studie. První část studie byla zaměřena na bezpečnost a druhá část na účinnost kandidátního léčiva. Studie byla nadesignována tak, že v první části byli pacienti rozděleni do čtyř skupin s týdenním dávkováním CT-322 po 1 a 2 mg/kg a z toho dvě skupiny (skupiny s dávkováním 1 a 2 mg/kg CT-322) dostávaly jednou za dva týdny 125 mg/m<sup>2</sup> Irinotecanu nebo 340 mg/m<sup>2</sup> Irinotecanu pro pacienty beroucí enzymy indukující antiepileptika. V druhé části byli pacienti rozděleni obdobně do 4 skupin se stejným dávkováním jako v první části. Do testování se přihlásilo celkem 66 pacientů, z toho 2 pacienti byli označeni jako nevhodní a 1 pacient odstoupil před zahájením testování. Kritéria pro výběr pacientů byla následující: minimální věk 18 let; recidivující GBM s měřitelným nádorem na magnetické rezonanci; Karnofského skóre (Karnofsky performance status = KPS)  $\geq 70\%$ ; dostatečně funkční kostní dřeň, játra a ledviny; bez předchozí anti-VEGF terapie, krvácení v CNS a plné antikoagulační léčby. Podle Karnofského skóre se hodnotí celkový stav pacienta (100 % - zcela zdravý, 0 % - smrt). Všichni pacienti podstoupili předchozí radioterapii a chemoterapii. Ve studii byl nastaven primární koncový bod po šesti měsících a sekundární po dvanácti měsících od zahájení. Jako primární koncový bod je na rozdíl od sekundárního koncového bodu vždy nastaven parametr, který je klíčový pro klinický přínos a studie je pro něj specificky nastavena. Pro každou skupinu byla určena nulová hypotéza PFS (doba přežití bez progresu)-6/12  $\leq 12\%$  (p0) a alternativní hypotéza PFS-6/12  $\geq 35\%$  (p1). Nulová hypotéza je statistická

hypotéza, která je formulována negativně vůči tomu, co chceme prokázat. Cílem testování je tedy zamítnout nulovou hypotézu a přijmout alternativní hypotézu. K vyhodnocování byl použit Kaplanův-Meierův odhad funkce přežití.

Ačkoli u valné většiny pacientů se v průběhu studie vyskytly vedlejší účinky různé škály závažnosti, žádný z nich nebyl natolik závažný, aby vedl k ukončení studie. Nicméně za zmínku stojí uvést, že u 6 pacientů byla přerušena terapie z důvodů vážnějších vedlejších účinků. Z toho u dvou pacientů se vyskytla infúzní reakce, která je jisto spojená s terapií. U dalších čtyř pacientů je spojení vedlejších účinků s terapií předmětem diskuze.

Data ze skupiny s dávkováním CT-322 2 mg/kg ukázaly nedostatečnou účinnost a nulová hypotéza nemohla být zamítnuta. Tudíž byla studie ze strategických důvodů sponzorem předčasně ukončena. Výsledky dále ukázaly, že vyšší dávky CT-322 (2 mg/kg), ať jako monoterapie nebo v kombinaci s Irinotecanem, vykazovaly nižší účinnost.

Autoři článku uvádí jako 3 možné příčiny neúčinnosti CT-322 u recidivujících GBM následující:

1. CT-322 nedostatečně efektivně blokuje VEGFR-2 v klinice,
2. blokace VEGFR-2 není dostatečně efektivní způsob narušení VEGF-řízené angiogeneze u recidivujících GBM,
3. jakákoliv blokace VEGF-řízené angiogeneze není efektivní způsob léčby GBM (Schiff et al., 2014).

### 4.3. PRS-050

V publikaci z roku 2007 se nachází první zmínka o Anticalinu na základě struktury lipocalinu z lidských slz cílcí VEGF (Hohlbaum a Skerra, 2007). PRS-050 se specificky váže s afinitou v pikomolární šíři na všechny sestřihové varianty VEGF-A a neutralizuje je. Zabraňuje vazbu ligandu na jeho receptory (VEGFR-1 a VEGFR-2) a tedy inhibuje angiogenezi. Účinnost PRS-050 byla demonstrována na *in vitro* i *in vivo* modelech. Farmakokinetické vlastnosti (prodloužení poločasu života v plazmě) byly upraveny PEGylací (Gille et al., 2008).

PRS-050 vstoupil v roce 2010 do první fáze KT. Hlavním cílem bylo potvrdit bezpečnost léčiva a určit optimální dávkování pro další fáze KT. Dále byla určována farmakodynamika a farmakokinetika a sledována léčebná odpověď u nádorů. Studie byla provedena na skupině 26-ti (25-ti vyhodnocených) dospělých pacientů s pokročilou nebo recidivující nebo metastázující rakovinou rezistentní vůči klasické léčbě nebo bez dostupné léčby. U většiny pacientů během podávání PRS-050 byla neměřitelná hodnota koncentrace volného VEGF-A. Naopak byl zjištěn komplex VEGF-A/PRS-050 a tedy přímé prokázání úspěšné vazby PRS-050 na VEGF-A. Maximální tolerovatelná dávka nebyla dosažena, neboť PRS-050 byl dobře snášen při maximální testované dávce 10 mg/kg. Pro další fáze KT bylo stanoveno doporučené dávkování 6 mg/kg infúzně podáváno po dobu dvou hodin jednou za dva týdny. Během studie se nevyskytla žádná závažná bezpečnostní rizika prokazatelně spojená s podáváním PRS-050, pouze vedlejší účinky jako zimnice, únava, zvýšený krevní tlak a nevolnost. PRS-050 se jeví jako neimunogenní, protože všechny testy na

protilátky proti PRS-050 byly negativní. PRS-050 vykazuje klasické výhody ne-imunoglobulinové struktury nad již schválenou mAb bevacizumab, jako například absence Fc domény a možnosti snadné produkce v E.coli (Mross et al., 2013). Ačkoliv k dalšímu porovnání výhod/nevýhod a především účinnosti by bylo zapotřebí dalších studií na větší skupině pacientů. Nicméně sponzor (společnost Pieris) se i přes úspěšně dokončenou první fázi KT rozhodl dále nepokračovat v dalších fázích KT a to z důvodu komerčního - nebyla nalezena prokazatelně jasná konkurenční výhoda nad ostatními existujícími anti-VEGF terapeutiky ("PRS-050," n.d.).

#### 4.4. MP0250

MP0250 je bispecifický DARPIn cílící VEGF a HGF. Jejich neutralizací inhibuje dvě významné dráhy (VEGF/VEGFR a HGF/MET) zapojené v nádorovém růstu, přežití, angiogenezi, invazi a tvorbě metastáz ("MP0250/MP0274," n.d.). V preklinické studii byl testován MP0250 v xenotransplantátových modelech z nádorů pacientů s rakovinou ledvin, jater, plic a žaludku. MP0250 ukázal potenciál silné inhibice nádorového růstu a v některých případech i překonal účinnost standardní terapie a navíc nebyla pozorována žádná toxicita (Fiedler et al., 2014). MP0250 vstoupil do první fáze klinického testování v červnu 2014 (NCT02194426). Více informací by mělo být publikováno v průběhu tohoto roku (2015).

### 5. Schválená antiangiogenní bioléčiva

K roku 2015 byly již schváleny tři antiangiogenní bioléčiva k léčbě nádorových onemocnění. Z toho dvě mAbs (bevacizumab a ramucirumab) a jeden fúzní protein (aflibercept).

#### 5.1. Bevacizumab

Bevacizumab (=avastin, BV) je humanizovaná mAb, která specificky cílí a inhibuje VEGF-A (stejně jako PRS-050). V roce 2009 na základě výsledků dvou klinických studií ve Fázi II ((Friedman et al., 2009) a (Kreisl et al., 2009)) udělila FDA urychlené schválení BV, jako monoterapeutika k použití ve druhé linii léčby GBM. Druhá linie léčby je použita, pokud primární terapie nezabírá. V prvním KT byli pacienti náhodně rozděleni na dvě skupiny. První skupině o velikosti 85-ti pacientů (n=85) bylo podáváno 10 mg/kg BV ob týden a druhé skupině (n=82) kombinace BV a chemoterapeutika irinotecanu ob týden. Výsledky studie byly následující: PFS-6 v první skupině bylo 42,6 % a 50,3 % ve druhé skupině, median OS byl 9,2 měsíců v první skupině a 8,7 měsíců ve druhé skupině (Friedman et al., 2009). Ve druhém KT byli pacienti (n=48) ze začátku léčeni pouze BV (10 mg/kg ob týden) a po progresi nádoru jim byl přidán irinotecan. Výsledky studie byly následující: PFS-6 29 % a median OS 31 týdnů (Kreisl et al., 2009). Nicméně účinnost BV jako

terapeutika druhé linie GBM je stále diskutována. Podle (Khasraw et al., 2014) jsou výsledky KT nedostačující a provedení dalších KT pro posouzení účinnosti BV je nezbytné. BV byl také testován jako terapeutikum první linie v kombinaci s doposud nejlepší standardní léčbou GBM – s radioterapií a chemoterapeutikem temozolomidem. Výsledky dvou téměř identicky nastavených třetích fází KT prokázaly prodloužení PFS zhruba o 3-4 měsíce ovšem bez vlivu na OS (Gilbert et al., 2014) a (Chinot et al., 2014). Na základě těchto výsledků nebyl BV schválen jako terapeutikum první linie.

BV byl doposud schválen jako součást léčby 6 druhů nádorů - metastázující kolorektální karcinom, metastázující NSCLC, metastázující karcinom ledvin, recidivující GBM, platina rezistentní ovariální karcinom a persistentní, recidivující nebo metastázující karcinom děložního čípku (“Avastin® (bevacizumab),” n.d.).

## 5.2. Ramucirumab

Ramucirumab (=cyramza) je lidská mAb IgG1, která specificky cílí VEGFR-2. Na základě výsledků třetí fáze KT (Garon et al., 2014) byla v roce 2014 v kombinaci s chemoterapeutikem docetaxel schválena k léčbě metastázující NSCLC v pokročilém stádiu nebo po předchozí chemoterapii platinou. V třetí fázi KT byly dvě skupiny pacientů. První skupině (n=628) byla podávána kombinace ramucirumabu a docetaxelu a druhé skupině (n=625) byla podávána kombinace placebo a docetaxelu. Výsledky studie prokázaly zvýšení OS z 9.1 měsíců u placebo skupiny na 10.5 měsíce u ramucirumab skupiny a zvýšení PFS z tří měsíců na 4.5 (Garon et al., 2014). Dále v roce 2014 byl ramucirumab schválen k léčbě adenokarcinomu žaludku nebo gastroesofageálního spojení v pokročilém stádiu nebo po předešlé léčbě chemoterapií. Na základě výsledků dvou třetích fází KT byl schválen k léčbě jako monoterapie (Fuchs et al., 2014) a v kombinaci s chemoterapií paclitaxel (Wilke et al., 2014). U monoterapie došlo k zvýšení OS z 3.8 měsíců u placebo skupiny (n=117) na 5.2 měsíců u ramucirumab skupiny (n=238) a ke zvýšení PFS z 1.3 měsíce na 2.1 měsíce (Fuchs et al., 2014). V kombinaci s paclitaxelem došlo k navýšení OS ze 7.4 měsíce u placebo+paclitaxel (n=335) skupiny na 9.6 měsíce u ramucirumab+paclitaxel skupiny (n=330) a navýšení PFS z 2.9 měsíců na 4.4 měsíců (Wilke et al., 2014).

Z těchto výsledků klinických studií je zajímavé, jak relativně nízké zvýšení OS (~ 1-2 měsíce) je dostačující pro schválení nové terapie. Proto především u sekundární linie léčby, která bývá paliativní (prodloužení života u nevléčitelné nemoci), je důležité analyzovat, zda vedlejší účinky přidané biologické léčby k chemoterapeutiku nesnižují pacientovo kvalitu života.

## 5.3. Aflibercept

Aflibercept (=zaltrap) je fúzní protein vytvořený z extracelulárních vazebných domén VEGFR-1 a -2 spojených s Fc IgG. Aflibercept specificky cílí a inhibuje VEGF-A, -B a PLGF. Na základě výsledků



klinické studie ve Fázi III ([Cutsem et al., 2012](#)) byl v roce 2012 schválen v kombinaci s chemoterapií FOLFIRI (5-fluorouracil, leukovorin a irinotecan) k léčbě metastazujícího kolorektálního karcinomu po předešlé terapii oxaliplatinou. Ve studii byli pacienti rozděleni náhodně do dvou skupin. První skupina (n=612) dostávala kombinaci afliberceptu (4 mg/kg) + FOLFIRI a druhá (n=614) kombinaci placeba + FOLFIRI. Výsledky byly následující: prodloužení medianu OS z 12.06 měsíce u placebo skupiny na 13.50 měsíce u aflibercept skupiny a prodloužení medianu PFS z 4.67 na 6.90 měsíce. Nicméně median OS zcela nereflktuje výhody afliberceptu, protože křivka přeživších první skupiny (aflibercept+FOLFIRI) po 18, 24 a 30 měsících převažuje nad přeživší křivkou placebo skupiny mnohem více ([Cutsem et al., 2012](#)).

## 6. Porovnání AVP v KT se schválenými antiangiogenními biolécivý

První zástupce AVP v KT CT-322 zamýšlený k léčbě GBM v kombinaci s chemoterapií (irinotecanem) a jako monoterapie nepotvrdil svojí účinnost ve druhé fázi KT. Účinnost byla posuzována podle PFS-6 a jelikož nemohla být zamítnuta nulová hypotéza primárního koncového bodu (PFS-6  $\leq$  12 %), bylo testování předčasně ukončeno. Autoři článku uvádějí jako jeden ze tří možných důvodů nedostatečné účinnosti CT-322 u recidivujících GBM to, že jakákoliv blokáce VEGF-řízené angiogeneze není efektivní způsob léčby GBM ([Schiff et al., 2014](#)). Toto tvrzení můžeme zpochybnit z důvodu schválení mAb bevacizumab v sekundární linii terapie. Nicméně musíme být opatrní, protože nad účinností BV se stále vedou diskuze a jeho myšlená účinnost může být způsobena pouze nevhodně zvolenou metodou vyhodnocování KT. Tím je PFS, které je měřeno magnetickou rezonancí (MRI). Jelikož antiangiogenní terapie způsobuje stabilizaci růstu kapilár, může docházet k nabytí mylného dojmu protinádorového efektu z obrázků MRI. Tomuto tvrzení nahrávají výsledky KT ([Gilbert et al., 2014](#)) a ([Chinot et al., 2014](#)), které vykazují zvýšení PFS ovšem bez vlivu na OS.

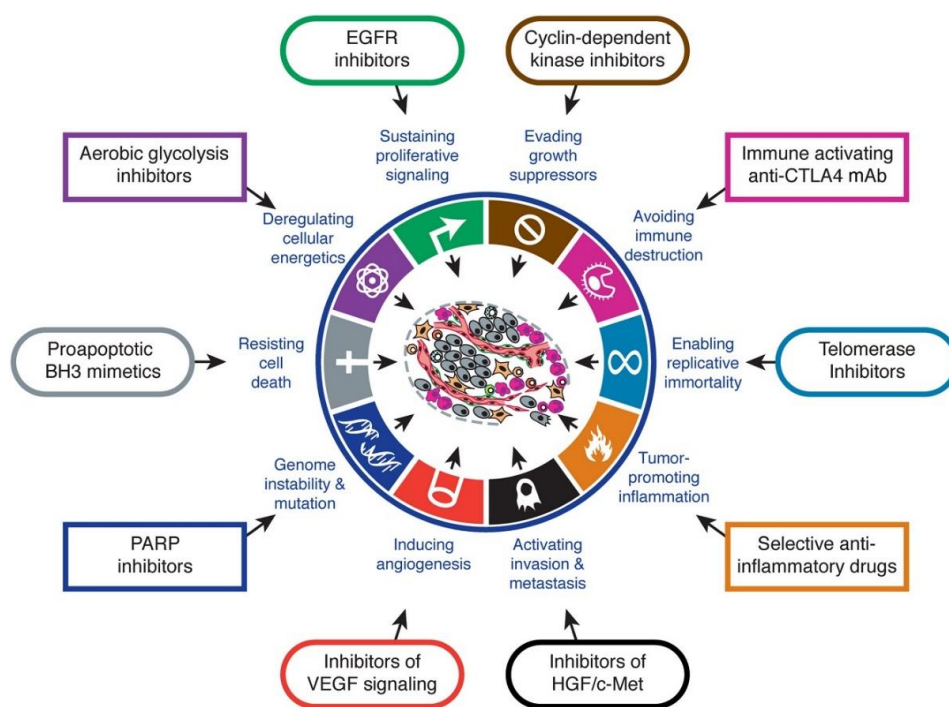
Jako druhý možný důvod nedostatečné účinnosti CT-322 u recidivujících GBM je uváděno, že blokáce VEGFR-2 není dostatečně efektivní způsob narušení VEGF-řízené angiogeneze u recidivujících GBM. Další schválená mAb ramucirumab stejně jako CT-322 inhibuje angiogenezi přes blokáci VEGFR-2. Byla schválena v kombinaci s chemoterapeutikem (docetaxel) k léčbě metastazující NSCLC a v kombinaci s chemoterapeutikem (paclitaxel) nebo jako monoterapie k léčbě adenokarcinomu žaludku nebo gastroesofageálního spojení. Nicméně je pravděpodobné, že každý druh rakoviny a jejich metastáze v různých vývojových stupních vykazují rozdílné mechanismy vaskularizace. Proto úspěch ramucirumabu nemůže vést k zpochybnění tvrzení - blokáce VEGFR-2 není dostatečně efektivní způsob narušení VEGF-řízené angiogeneze u recidivujících GBM.

Posledním uváděným důvodem neúspěchu je nedostatečná blokáce VEGFR-2 v klinice. V tomto ohledu by mohly být příčinou nekvalitně a nevhodně provedené preklinické studie. O tomto problému pojednává ([Begley a Ellis, 2012](#)). Bylo zjištěno, že velmi málo publikovaných klíčových preklinických studií je reprodukovatelných. Příčinou toho můžou být mylně interpretovaná data, nevhodně zvolený zvířecí model a strategie testování dané látky. Obecně onkologické klinické studie vykazují nejvyšší míru neúspěchu ([Begley a Ellis, 2012](#)).

Dalším zástupcem AVP v KT byl PRS-050. Přes úspěšné dokončení první fáze KT se sponzor rozhodl dále nepokračovat v KT z důvodu nenalezení jasné konkurenční výhody nad ostatními anti-VEGF terapeutiky. Nicméně výsledky tohoto KT ukázaly, že PRS-050 je bezpečný, dobře snášen a především neimunogenní. Proto je nasnadě, že budou vyvinuty další především bi- a multispecifické Anticalin molekuly připravené na základě racionální designu cílící různé molekuly s novým mechanismem účinku.

Významnou roli v cílené antiangiogenní terapii hraje výskyt různých rezistencí. Jejich mechanismus a vznik popisuje rešerše (Vasudev a Reynolds, 2014). Pro vytvoření opravdu efektivní antiangiogenní terapie bude do budoucna potřeba zjistit detailně rozdíly ve vaskularizaci a mechanismy resistance. Na základě těchto znalostí bude třeba vytvořit cílená antiangiogenní terapeutika specifická pro individuální typy rakoviny. K tomu s výhodou budou moci posloužit lehce upravovatelné AVP.

D.Hanahan a R.Weinberg publikovali v roce 2000 velmi vlivný článek (Hanahan a Weinberg, 2000) popisující šest základních charakteristických vlastností rakoviny (z angl. orig. hallmarks of cancer). Autoři předpokládají, že většina rakovin, ne-li všechny, sdílí těchto šest změn v buněčné fyziologii důležitých pro kancerogenezi – soběstačnost v růstových signálech, necitlivost k protirůstovým signálům, uniknutí buněčné smrti, replikační nesmrtelnost, indukce angiogeneze a aktivace invaze a tvorba metastáz. V roce 2011 vyšla aktualizace článku (Hanahan a Weinberg, 2011) z roku 2000 popisující další dvě nové charakteristické vlastnosti – únik imunitnímu systému a deregulace buněčné energetiky. Navíc byly navrženy dvě charakteristiky



Obrázek 11 Příklady terapeutického cílení charakteristických znaků rakoviny. Přijato od (Hanahan a Weinberg, 2011).

umožňující vznik charakteristických vlastností – genomová nestabilita a mutace a zánětlivé prostředí podporující vznik nádorů. Podstatou cílené nádorové terapie je specifické cílení a inhibice charakteristických znaků rakoviny (obr.11). Většina ze současných specifických terapeutik cílí pouze jednu z těchto charakteristických vlastností, což je výhodné z důvodu nižší nespecifické toxicity. V případě, že jsou jednotlivé charakteristické vlastnosti pro rakovinu opravdu tak důležité, mělo by to stačit k potlačení jejího růstu a šíření.

Nicméně výsledky KT napovídají tomu, že daná problematika nebude tak jednoduchá. Ve skutečnosti efekt většiny monospecifických terapeutik je pouze dočasný s velmi často se vyskytujícími recidivami. Jako možné řešení tohoto problému se nabízí míření více cílů jedné charakteristické vlastnosti nebo cílení více charakteristických vlastností najednou (Hanahan a Weinberg, 2011). A tímto se dostáváme k poslednímu zástupci AVP v KT bispecifické molekule MP0250, která cílí jak angiogenezi (VEGF) tak invazivitu a tvorbu metastáz (HGF). Bude velmi zajímavé sledovat výsledky KT a to, zda naplní svůj potenciál z preklinického testování, který jako bispecifická molekula cílící dvě charakteristické vlastnosti rakoviny má.

## 7. Závěr

V této bakalářské práci jsem shrnul nejnovější pokroky týkající se AVP na poli nádorových terapeutik. Do budoucna se zdá být největší výzvou vytvoření multispecifických nádorových terapeutik, které budou cílit více charakteristických znaků rakoviny naráz. To povede k omezení nutnosti kombinovat více druhů terapií a tedy ke snížení celkové nespecifické toxicity. Obecně specificky cílená bioléciva mají oproti chemoterapii a radioterapii nesmírnou výhodu, co se týče nižších vedlejších účinků a minimální snížení kvality života následkem terapie. Úspěšnost terapeutických proteinů již demonstruje několik schválených monoklonálních protilátek. Je ale potřeba si uvědomit, že vývoj monoklonálních protilátek má oproti AVP dvě dekády náskok. Jednou z výhod AVP je dostupnost velké škály struktur oproti imunoglobulinům a poměrně jednoduchá a rychlá selekce proti libovolnému cíli z knihoven obsahující až  $10^{20}$  proteinových variant, což by v budoucnu mohlo hrát významnou roli v přípravě terapie šité na míru pacientovi. Robustní struktury AVP na rozdíl od imunoglobulinů jsou vhodné pro racionální návrh a také pro fúzi s ostatními strukturami nebo protilátkami. Další potenciální výhodou je jejich možnost snadného spojení s radionuklidy, toxiny nebo s onkolytickými viry. Struktury AVP jsou většinou nezávislé na disulfidických můstcích a nevyžadují postranslační modifikace a proto není problém je ve velkém vyrábět v bakteriálních expresních systémech.

Dále jsou také shrnuty výsledky prvních zástupců AVP v KT a bioléciv cílících stejné cíle. Zástupci AVP v KT sice neprokázali účinnost, ale prokázali bezpečnost a neimunogenicitu. V současné době se nachází několik potenciálních nádorových terapeutik v preklinickém vývoji. Lze tedy očekávat v blízké době vstup dalších AVP do KT. Tomu také nahrávají nepříliš oslňující výsledky protilátkových nádorových terapeutik v KT, které jsou v současné době dostačující pro schválení k léčbě. Vzhledem k omezení plynoucí z jejich struktury je vylepšení jejich účinnosti omezené.



## 8. Použitá literatura

- Ackermann, M., Morse, B.A., Delventhal, V., Carvajal, I.M., Konerding, M.A., 2012. Anti-VEGFR2 and anti-IGF-1R-Adnectins inhibit Ewing's sarcoma A673-xenograft growth and normalize tumor vascular architecture. *Angiogenesis* 15, 685–695. doi:10.1007/s10456-012-9294-9
- 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, 2087–2095. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0366
- Begley, C.G., Ellis, L.M., 2012. Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 483, 531–533.
- 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.* 96, 1898–1903. doi:10.1073/pnas.96.5.1898
- Bird, R., Hardman, K., Jacobson, J., Johnson, S., Kaufman, B., Lee, S., Lee, T., Pope, S., Riordan, G., Whitlow, M., 1988. Single-Chain Antigen-Binding Proteins. *Science* 242, 423–426. doi:10.1126/science.3140379
- Brack, S., Attinger-Toller, I., Schade, B., Mourlane, F., Klupsch, K., Woods, R., Hachemi, H., Bey, U. von der, 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, 2030–2039. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0046-T
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307. doi:10.1038/nature10144
- Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A.A., Hilton, M., Abrey, L., Cloughesy, T., 2014. Bevacizumab plus Radiotherapy-Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 709–722. doi:10.1056/NEJMoa1308345
- Cuesta, Á.M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B., Álvarez-Vallina, L., 2010. Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol.* 28, 355–362. doi:10.1016/j.tibtech.2010.03.007
- Cutsem, E.V., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausová, J., Macarulla, T., Ruff, P., Hazel, G.A. van, Moiseyenko, V., Ferry, D., McKendrick, J., Polikoff, J., Tellier, A., Castan, R., Allegra, C., 2012. Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen. *J. Clin. Oncol.* 30, 3499–3506. doi:10.1200/JCO.2012.42.8201
- Denayer, T., Stoehr, T., Beste, G., Brige, A., Ververken, C., Holz, J.-B., 2013. The anti-c-Met Nanobody (R), a novel and promising anti-cancer therapeutic. *Cancer Res.* 73. doi:10.1158/1538-7445.AM2013-LB-316
- 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. doi:10.1038/ncomms6237
- Devy, L., Rabbani, S.A., Stochl, M., Ruskowski, M., Mackie, I., Naa, L., Toews, M., Gool, R. van, Chen, J., Ley, A., Ladner, R.C., Dransfield, D.T., Henderikx, P., 2007. PEGylated DX-1000: Pharmacokinetics and Antineoplastic Activity of a Specific Plasmin Inhibitor. *Neoplasia N. Y.* N 9, 927.
- 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, 419–429. doi:10.1093/protein/gzu016

- Dineen, S.P., Sullivan, L.A., Beck, A.W., Miller, A.F., Carbon, J.G., Mamluk, R., Wong, H., Brekken, R.A., 2008. The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumor burden in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 8, 352. doi:10.1186/1471-2407-8-352
- Ebersbach, H., Fiedler, E., Scheuermann, T., Fiedler, M., Stubbs, M.T., Reimann, C., Proetzel, G., Rudolph, R., Fiedler, U., 2007. Affilin—Novel Binding Molecules Based on Human  $\gamma$ -B-Crystallin, an All  $\beta$ -Sheet Protein. *J. Mol. Biol.* 372, 172–185. doi:10.1016/j.jmb.2007.06.045
- Eigenbrot, C., Ultsch, M., Dubnovitsky, A., Abrahmsén, L., Härd, T., 2010. Structural basis for high-affinity HER2 receptor binding by an engineered protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15039–15044. doi:10.1073/pnas.1005025107
- Ekerljung, L., Wallberg, H., Sohrabian, A., Andersson, K., Friedman, M., Frejd, F.Y., Stahl, S., Gedda, L., 2012. Generation and Evaluation of Bispecific Affibody Molecules for Simultaneous Targeting of EGFR and HER2. *Bioconjug. Chem.* 23, 1802–1811. doi:10.1021/bc3000645
- Fiedler, U., Stumpp, M.T., Cornelius, A., Ekawardhani, S., Dawson, K.M., Gilboy, P., Dolado, I., 2014. Antitumor activity of MP0250, a bispecific VEGF- and HGF-targeting darpin, in patient-derived xenograft models. *J. Clin. Oncol.* 32:5s.
- \*Folkman, J., Bach, M., Rowe, J., Davidoff, F., Lambert, P., Hirsch, C., Goldberg, A., Hiatt, H., Glass, J., Henshaw, E., 1971. Tumor Angiogenesis - Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–&.
- Frankel, S.R., Baeuerle, P.A., 2013. Targeting T cells to tumor cells using bispecific antibodies. *Curr. Opin. Chem. Biol., Next generation therapeutics • Energy* 17, 385–392. doi:10.1016/j.cbpa.2013.03.029
- Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., Vredenburgh, J., Huang, J., Zheng, M., Cloughesy, T., 2009. Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 4733–4740. doi:10.1200/JCO.2008.19.8721
- Friedrich, K., Hanauer, J.R., Prüfer, S., Münch, R.C., Völker, I., Filippis, C., Jost, C., Hanschmann, K.-M., Cattaneo, R., Peng, K.-W., Plückthun, A., Buchholz, C.J., Cichutek, K., Mühlebach, M.D., 2013. DARPIn-targeting of Measles Virus: Unique Bispecificity, Effective Oncolysis, and Enhanced Safety. *Mol. Ther.* 21, 849–859. doi:10.1038/mt.2013.16
- Fuchs, C.S., Tomasek, J., Yong, C.J., Dumitru, F., Passalacqua, R., Goswami, C., Safran, H., dos Santos, L.V., Aprile, G., Ferry, D.R., Melichar, B., Tehfe, M., Topuzov, E., Zalberg, J.R., Chau, I., Campbell, W., Sivanandan, C., Pikiel, J., Koshiji, M., Hsu, Y., Liepa, A.M., Gao, L., Schwartz, J.D., Taberner, J., 2014. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 383, 31–39. doi:10.1016/S0140-6736(13)61719-5
- Garon, E.B., Ciuleanu, T.-E., Arrieta, O., Prabhaskar, K., Syrigos, K.N., Goksel, T., Park, K., Gorbunova, V., Kowalyszyn, R.D., Pikiel, J., Czyzewicz, G., Orlov, S.V., Lewanski, C.R., Thomas, M., Bidoli, P., Dakhil, S., Gans, S., Kim, J.-H., Grigorescu, A., Karaseva, N., Reck, M., Cappuzzo, F., Alexandris, E., Sashegyi, A., Yurasov, S., Pérol, M., 2014. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *The Lancet* 384, 665–673. doi:10.1016/S0140-6736(14)60845-X
- Gebauer, M., Schiefner, A., Matschiner, G., Skerra, A., 2013. Combinatorial Design of an Anticalin Directed against the Extra-Domain B for the Specific Targeting of Oncofetal Fibronectin. *J. Mol. Biol.* 425, 780–802. doi:10.1016/j.jmb.2012.12.004
- Gebauer, M., Skerra, A., 2009. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 245–255. doi:10.1016/j.cbpa.2009.04.627

- Getmanova, E.V., Chen, Y., Bloom, L., Gokemeijer, J., Shamah, S., Warikoo, V., Wang, J., Ling, V., Sun, L., 2006. Antagonists to Human and Mouse Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Generated by Directed Protein Evolution In Vitro. *Chem. Biol.* 13, 549–556. doi:10.1016/j.chembiol.2005.12.009
- Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P.D., Jaeckle, K.A., Schiff, D., Stieber, V.W., Brachman, D.G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I.W., Sulman, E.P., Aldape, K.D., Curran, W.J., Mehta, M.P., 2014. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 699–708. doi:10.1056/NEJMoa1308573
- Gille, H., Huelsmeyer, M., Christian, H.-J., Matschiner, G., Trentmann, S., Skerra, A., Hohlbaum, A., 2008. Discovery and characterization of a novel Anticalin with potent in vivo antagonistic activity towards VEGF-A. *AACR Meet. Abstr.* 2008, 4077.
- 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, 3196–3204. doi:10.1074/jbc.M609211200
- Hamerscasterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E., Bendahman, N., Hamers, R., 1993. Naturally-Occurring Antibodies Devoid of Light-Chains. *Nature* 363, 446–448. doi:10.1038/363446a0
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C., Muyldermans, S., 2013. Nanobodies and their potential applications. *Nanomed.* 8, 1013–1026. doi:10.2217/nnm.13.86
- Hoffmann, A., Kovermann, M., Lilie, H., Fiedler, M., Balbach, J., Rudolph, R., Pfeifer, S., 2012. New Binding Mode to TNF-Alpha Revealed by Ubiquitin-Based Artificial Binding Protein. *PLoS ONE* 7, e31298. doi:10.1371/journal.pone.0031298
- Hohlbaum, A.M., Skerra, A., 2007. Anticalins®: the lipocalin family as a novel protein scaffold for the development of next-generation immunotherapies. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 3, 491–501. doi:10.1586/1744666X.3.4.491
- Holliger, P., Prospero, T., Winter, G., 1993. Diabodies - Small Bivalent and Bispecific Antibody Fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6444–6448. doi:10.1073/pnas.90.14.6444
- Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., Philpott, K., 2011. Principles of early drug discovery: Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1239–1249. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x
- Jeong, K.J., Mabry, R., Georgiou, G., 2005. Avimers hold their own. *Nat. Biotechnol.* 23, 1493–1494. doi:10.1038/nbt1205-1493
- Jost, C., Schilling, J., Tamaskovic, R., Schwill, M., Honegger, A., Plückthun, A., 2013. Structural basis for eliciting a cytotoxic effect in HER2-overexpressing cancer cells via binding to the extracellular domain of HER2. *Struct. Lond. Engl.* 1993 21, 1979–1991. doi:10.1016/j.str.2013.08.020
- Khasraw, M., Ameratunga, M.S., Grant, R., Wheeler, H., Pavlakis, N., 2014. Antiangiogenic therapy for high-grade glioma. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD008218. doi:10.1002/14651858.CD008218.pub3
- Kim, J.W., Cochran, F.V., Cochran, J.R., 2015. A Chemically Cross-Linked Knottin Dimer Binds Integrins with Picomolar Affinity and Inhibits Tumor Cell Migration and Proliferation. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 6–9. doi:10.1021/ja508416e

- Kimura, R.H., Levin, A.M., Cochran, F.V., Cochran, J.R., 2009. Engineered cystine knot peptides that bind  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ , and  $\alpha 5\beta 1$  integrins with low-nanomolar affinity. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 77, 359–369. doi:10.1002/prot.22441
- Kohler, G., Milstein, C., 1975. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* 256, 495–497. doi:10.1038/256495a0
- Koide, A., Wojcik, J., Gilbreth, R.N., Hoey, R.J., Koide, S., 2012. Teaching an Old Scaffold New Tricks: Monobodies Constructed Using Alternative Surfaces of the FN3 Scaffold. *J. Mol. Biol.* 415, 393–405. doi:10.1016/j.jmb.2011.12.019
- Kontermann, R.E., 2011. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22/6 Chemical biotechnology and Pharmaceutical biotechnology 22, 868–876. doi:10.1016/j.copbio.2011.06.012
- Kreisl, T.N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., Garren, N., Mackey, M., Butman, J.A., Camphausen, K., Park, J., Albert, P.S., Fine, H.A., 2009. Phase II Trial of Single-Agent Bevacizumab Followed by Bevacizumab Plus Irinotecan at Tumor Progression in Recurrent Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 740–745. doi:10.1200/JCO.2008.16.3055
- Lee, J., Kim, H.J., Yang, C.-S., Kyeong, H.-H., Choi, J.-M., Hwang, D.-E., Yuk, J.-M., Park, K., Kim, Y.J., Lee, S.-G., Kim, D., Jo, E.-K., Cheong, H.-K., Kim, H.-S., 2014. A High-Affinity Protein Binder that Blocks the IL-6/STAT3 Signaling Pathway Effectively Suppresses Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol. Ther.* 22, 1254–1265. doi:10.1038/mt.2014.59
- 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.* 109, 3299–3304. doi:10.1073/pnas.1113193109
- Le Gall, F., Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., Little, M., 1999. Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding. *FEBS Lett.* 453, 164–168. doi:10.1016/S0014-5793(99)00713-9
- Lipovšek, D., 2011. Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics. *Protein Eng. Des. Sel.* 24, 3–9. doi:10.1093/protein/gzq097
- Lorey, S., Fiedler, E., Kunert, A., Nerkamp, J., Lange, C., Fiedler, M., Bosse-Doenecke, E., Meysing, M., Gloser, M., Rundfeldt, C., Rauchhaus, U., Hänssgen, I., Göttler, T., Steuernagel, A., Fiedler, U., Haupts, U., 2014. Novel Ubiquitin-derived High Affinity Binding Proteins with Tumor Targeting Properties. *J. Biol. Chem.* 289, 8493–8507. doi:10.1074/jbc.M113.519884
- Malm, M., Kronqvist, N., Lindberg, H., Gudmundsdotter, L., Bass, T., Frejd, F.Y., Höidén-Guthenberg, I., Varasteh, Z., Orlova, A., Tolmachev, V., Ståhl, S., Löfblom, J., 2013. Inhibiting HER3-mediated tumor cell growth with affibody molecules engineered to low picomolar affinity by position-directed error-prone PCR-like diversification. *Plos One* 8, e62791–e62791. doi:10.1371/journal.pone.0062791
- 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.
- Marmor, M.D., Skaria, K.B., Yarden, Y., 2004. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol.* 58, 903–913. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.06.002

- Moore, S.J., Leung, C.L., Cochran, J.R., 2012. Knottins: disulfide-bonded therapeutic and diagnostic peptides. *Drug Discov. Today Technol., Peptides or modified peptides as drug molecules* 9, e3–e11. doi:10.1016/j.ddtec.2011.07.003
- Mouratou, B., Schaeffer, F., Guilvout, I., Tello-Manigne, D., Pugsley, A.P., Alzari, P.M., Pecorari, F., 2007. Remodeling a DNA-binding protein as a specific in vivo inhibitor of bacterial secretin PulD. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 17983–17988. doi:10.1073/pnas.0702963104
- Mross, K., Richly, H., Fischer, R., Scharr, D., Buechert, 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. doi:10.1371/journal.pone.0083232
- Murali, R., Greene, M.I., 2012. Structure Based Antibody-Like Peptidomimetics. *Pharmaceuticals* 5, 209–235. doi:10.3390/ph5020209
- Muyldermans, S., 2013. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 775–797. doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449
- Nelson, A.L., 2010. Antibody fragments. *mAbs* 2, 77–83. doi:10.4161/mabs.2.1.10786
- Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahamssén, L., Elmlblad, A., Holmgren, E., Henrichson, C., Jones, T.A., Uhlen, M., 1987. A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng.* 1, 107–113.
- Nilvebrant, J., Astrand, M., Lofblom, J., Hober, S., 2013. Development and characterization of small bispecific albumin-binding domains with high affinity for ErbB3. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3973–3985. doi:10.1007/s00018-013-1370-9
- 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, 772–777.
- Olwill, S.A., Joffroy, C., Gille, H., Vigna, E., Matschiner, G., Allersdorfer, A., Lunde, B.M., Jaworski, J., Burrows, J.F., Chiriaco, C., Christian, H.J., Hülsmeier, M., Trentmann, S., Jensen, K., Hohlbaum, A.M., Audoly, L., 2013. A Highly Potent and Specific MET Therapeutic Protein Antagonist with Both Ligand-Dependent and Ligand-Independent Activity. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2459–2471. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0318
- Orlova, A., Tran, T.A., Ekblad, T., Karlström, A.E., Tolmachev, V., 2010. (186)Re-maSGS-Z (HER2:342), a potential Affibody conjugate for systemic therapy of HER2-expressing tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 260–269. doi:10.1007/s00259-009-1268-9
- Plueckthun, A., 2015. Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPin): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. Vol 55* 55, 489–511. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654
- Reichert, J.M., Rosensweig, C.J., Faden, L.B., Dewitz, M.C., 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.* 23, 1073–1078. doi:10.1038/nbt0905-1073
- Reusch, U., Burkhardt, C., Fucek, I., Le Gall, F., Le Gall, M., Hoffmann, K., Knackmuss, S.H.J., Kiprijanov, S., Little, M., Zhukovsky, E.A., 2014. A novel tetravalent bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits. *Mabs* 6, 727–738. doi:10.4161/mabs.28591
- Reusch, U., Burkhardt, C., Knackmuss, S., Fucek, I., Eser, M., McAleese, F., Ellwanger, K., Little, M., 2013. A CD19/CD3 Bispecific Tandab, AFM11, Recruits T Cells To Potently and Safely Kill CD19+ Tumor Cells. *Blood* 122, 4405–4405.
- Richter, A., Eggenstein, E., Skerra, A., 2014. Anticalins: Exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett., Protein Engineering* 588, 213–218. doi:10.1016/j.febslet.2013.11.006

- Schiff, D., Kesari, S., de Groot, J., Mikkelsen, T., Drappatz, J., Coyle, T., Fichtel, L., Silver, B., Walters, I., Reardon, D., 2014. Phase 2 study of CT-322, a targeted biologic inhibitor of VEGFR-2 based on a domain of human fibronectin, in recurrent glioblastoma. *Invest. New Drugs*. doi:10.1007/s10637-014-0186-2
- Schönfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hülsmeier, M., Brown, N., Kaye, P.M., Schlehuber, S., Hohlbaum, A.M., Skerra, A., 2009. An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 8198–8203. doi:10.1073/pnas.0813399106
- Sha, F., Gencer, E.B., Georgeon, S., Koide, A., Yasui, N., Koide, S., Hantschel, O., 2013. Dissection of the BCR-ABL signaling network using highly specific monobody inhibitors to the SHP2 SH2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 14924–14929. doi:10.1073/pnas.1303640110
- Silverman, J., Lu, 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.C., 2005. Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1556–1561. doi:10.1038/nbt1166
- Slørdahl, T.S., Denayer, T., Moen, S.H., Standal, T., Børset, M., Ververken, C., Rø, T.B., 2013. Abstract 5624: Anti-c-Met Nanobody®: A potential new drug in cancer treatment. *Cancer Res.* 73, 5624–5624. doi:10.1158/1538-7445.AM2013-5624
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0086050
- Tiede, C., Tang, A.A.S., Deacon, S.E., Mandal, U., Nettleship, J.E., Owen, R.L., George, S.E., Harrison, D.J., Owens, R.J., Tomlinson, D.C., McPherson, M.J., 2014. Adhiron: a stable and versatile peptide display scaffold for molecular recognition applications. *Protein Eng. Des. Sel.* 27, 145–155. doi:10.1093/protein/gzu007
- Tolcher, A.W., Sweeney, C.J., Papadopoulos, K., Patnaik, A., Chiorean, E.G., Mita, A.C., Sankhala, K., Furfine, E., Gokemeijer, J., Iacono, L., Eaton, C., Silver, B.A., Mita, M., 2011. Phase I and Pharmacokinetic Study of CT-322 (BMS-844203), a Targeted Adnectin Inhibitor of VEGFR-2 Based on a Domain of Human Fibronectin. *Clin. Cancer Res.* 17, 363–371. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1411
- Tolmachev, V., Orlova, A., Pehrson, R., Galli, J., Baastrup, B., Andersson, K., Sandström, M., Rosik, D., Carlsson, J., Lundqvist, H., Wennborg, A., Nilsson, F.Y., 2007. Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a <sup>177</sup>Lu-labeled HER2-specific Affibody molecule. *Cancer Res.* 67, 2773–2782. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1630
- Tugues, S., Koch, S., Gualandi, L., Li, X., Claesson-Welsh, L., 2011. Vascular endothelial growth factors and receptors: Anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol. Aspects Med., Angiogenesis and Lymphangiogenesis* 32, 88–111. doi:10.1016/j.mam.2011.04.004
- Vasudev, N.S., Reynolds, A.R., 2014. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 17, 471–494. doi:10.1007/s10456-014-9420-y
- Walsh, G., 2014. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* 32, 992–1000. doi:10.1038/nbt.3040
- Waltz, E., 2006. Polyclonal antibodies step out of the shadows. *Nat. Biotechnol.* 24, 1181–1181. doi:10.1038/nbt1006-1181
- Wilke, H., Muro, K., Van Cutsem, E., Oh, S.-C., Bodoky, G., Shimada, Y., Hironaka, S., Sugimoto, N., Lipatov, O., Kim, T.-Y., Cunningham, D., Rougier, P., Komatsu, Y., Ajani, J., Emig, M., Carlesi, R., Ferry, D., Chandrawansa, K., Schwartz, J.D., Ohtsu, A., 2014. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15, 1224–1235. doi:10.1016/S1470-2045(14)70420-6

Ying, T., Gong, R., Ju, T.W., Prabakaran, P., Dimitrov, D.S., 2014. Engineered Fc based antibody domains and fragments as novel scaffolds. *Biochim. Biophys. Acta.* doi:10.1016/j.bbapap.2014.04.018

Zhu, J., Huang, H., Dong, S., Ge, L., Zhang, Y., 2014. Progress in Aptamer-Mediated Drug Delivery Vehicles for Cancer Targeting and Its Implications in Addressing Chemotherapeutic Challenges. *Theranostics* 4, 931–944. doi:10.7150/thno.9663

Zielinski, R., Lyakhov, I., Hassan, M., Kuban, M., Shafer-Weaver, K., Gandjbakhche, A., Capala, J., 2011. HER2-Affitoxin: A Potent Therapeutic Agent for the Treatment of HER2-Overexpressing Tumors. *Clin. Cancer Res.* 17, 5071–5081. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2887

### **Klinické studie**

NCT00635596, URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00635596?term=NCT00635596&rank=1> (přístup 4.26.15).

NCT01284231, URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01284231?term=NCT01284231&rank=1> (přístup 4.26.15).

NCT01723475, URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01723475?term=NCT01723475&rank=1> (přístup 4.26.15).

NCT02321592, URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02321592?term=NCT02321592&rank=1> (přístup 4.26.15).

NCT02106091, URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02106091?term=NCT02106091&rank=1> (přístup 4.26.15).

NCT00353756, URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00353756?term=NCT00353756&rank=1> (přístup 4.26.15).

NCT02194426, URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02194426?term=NCT02194426&rank=1> (přístup 4.26.15).

### **Patentové přihlášky**

Desmet, J., Lasters, I., Loverix, S., 2010. Single-chain antiparallel coiled coil proteins. WO2010066740 A1.

Lasters, I., Vaeck, M., Desmet, J., Debaveye, J., Deroo, S., Loverix, S., 2014. Binding agents to intracellular target molecules. WO2013102659 A2

### **Webové stránky**

Ablynx [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.ablynx.com/> (přístup 4.26.15).

Affilogic pipeline [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.affilogic.com/pipeline/nanofitin-therapeutics/> (přístup 4.26.15).

Affimers [WWW Dokument], n.d. URL <https://www.avactalifesciences.com/affimer-technology/> (přístup 5.14.15).

Avastin® (bevacizumab) [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.avastin-hcp.com/#> (přístup 4.26.15).

Bristol-Myers to acquire Adnexus Therapeutics, Reuters, 2007, URL

<http://www.reuters.com/article/2007/09/24/idUSIN20070924090240BMY20070924> (přístup 4.26.15)

Complix – Therapeutic focus [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.complix.com/therapeutic-focus/> (přístup 4.26.15).

Dyax [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.dyax.com/index.html> (přístup 4.26.15).

FDA, Approved Drugs - Blinatumomab [WWW Dokument], n.d. URL

<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm425597.htm> (přístup 4.26.15).

GEN | News Highlights [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.genengnews.com/gen-news-highlights/scil-raises-24m-to-take-two-affilin-candidates-into-phase-i-over-next-three-years/81244631/> (přístup 4.26.15).

MP0250/MP0274 [WWW Dokument], n.d. Mol. Partn. URL <http://www.molecularpartners.com/our-products/mp0250mp0274/> (přístup 4.26.15)

Pipeline – symphogen, [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.symphogen.com/pipeline> (přístup 4.26.15).

Promexus [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.promexus.com/> (přístup 4.26.15).

Pronectins [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.protelica.com/pronectins> (přístup 4.26.15).

Protelica pipeline [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.protelica.com/Pipeline> (přístup 4.26.15).

PRS-050 [WWW Dokument], n.d. URL <http://www.pieris.com/pipeline/proprietary-programs/prs-050> (přístup 4.26.15).

## Příloha:

### Přehled popsaných struktur:

(Seřazeno chronologicky podle data publikace)

#### PhytoCystatin A

*Adhiron: a stable and versatile peptide display scaffold for molecular recognition applications (2014)*

**Sso6901** - from *Sulfolobus solfataricus*  
**MIT (Microtubule Interacting and Transport) domain of Sso0909** - *Sulfolobus solfataricus*

**Tm0487** – from *Thermotoga maritima*

**Tm1112** - from *Thermotoga maritima*

**ChBD (Chitin Binding Domain) of Chitinase A** – from *Pyrococcus furiosus*

**N-terminal domain of the Ph 1500 protein** – from *Pyrococcus horikoshii*

6 nad - *Scaffold Diversification Enhances Effectiveness of a Superlibrary of Hyperthermophilic Proteins (2013)*

#### Variable lymphocyte receptors -

nonimmunoglobulin antibodies composed of Leucine-rich repeat modules  
*Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering (2012)*

#### SH3 domain hSH3N of the ADAP protein

*A novel hSH3 domain scaffold engineered to bind folded domains in CD2BP2 and HIV capsid protein (2012)*

#### Human tenascin-C, human fibronectin (15 FN3)

*Design of novel FN3 domains with high stability by a consensus sequence approach (2012)*

#### TLR4 (Toll-Like Receptor 4) decoy receptor

(Leucine Rich Repeat protein)  
*Structure-Based Rational Design of a Toll-like Receptor 4 (TLR4) Decoy Receptor with High Binding Affinity for a Target Protein (2012)*

#### Measles virus phosphoprotein P - three-helix bundle structure

*A novel, stable, helical scaffold as an alternative binder - construction of phage display libraries (2012)*

#### Three-finger(3F) neurotoxin protein -a snake a-neurotoxin

*Directed evolution of a three-finger neurotoxin by using cDNA display yields antagonists as well as agonists of interleukin-6 receptor signaling (2011)*

#### Sso7d protein - from *Sulfolobus solfataricus*

*Highly stable binding proteins derived from the hyperthermophilic Sso7d scaffold (2011)*

#### Avidin

*Modification of the loops in the ligand-binding site turns avidin into a steroid-binding protein (2011)*

#### Beta-loop

*A novel beta-loop scaffold of phage-displayed peptides for highly specific affinities (2011)*

#### HEAT repeat proteins - alpha Rep

*Design, Production and Molecular Structure of a New Family of Artificial Alpha-helical Repeat Proteins (alpha Rep) Based on Thermostable HEAT-like Repeats (2010)*

#### 4EBP1 - unstructured protein

*A Novel Unstructured Scaffold Based on 4EBP1 Enables the Functional Display of a Wide Range of Bioactive Peptides (2010)*

#### Trpzip class of beta-hairpin peptides

*An engineered tryptophan zipper-type peptide as a molecular recognition scaffold (2009)*

#### Sac7d - from *Sulfolobus acidocaldarius* – Nanofitins/Afittins

*Remodeling a DNA-binding protein as a specific in vivo inhibitor of bacterial secretin PulD (2007)*  
*Artificial binding proteins (afittins) as probes for conformational changes in secretin PulD (2008)*

#### DO ROKU 2007 (pod) – shrnuto v *Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition (2007)*

#### Stefin A - Affimers

*Peptide aptamers in label-free protein detection. 1. Characterization of the immobilized scaffold (2007)*

#### SH3 domain of human Fyn kinase (fynomer)

*A novel, non-immunogenic Fyn SH3-derived binding protein with tumor vascular targeting properties (2007)*

#### The zinc finger DNA-binding domain of the human retinoid-X-receptor (hRXR $\alpha$ )

*Directed evolution of ATP binding proteins from a zinc finger domain by using mRNA display (2006)*

#### Carbohydrate binding module from the xylanase of *Rhodothermus marinus*

*Evolution of a carbohydrate binding module into a protein-specific binder (2006)*

#### The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase

*PIN-bodies: a new class of antibody-like proteins with CD4 specificity derived from the protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (2006)*

#### DO ROKU 2005 – shrnuto v *Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains (2005)*