

NOVÉ FORMÁTY ANTIGEN-VÁZAJÍCÍCH MOLEKUL

ZUZANA BÍLKOVÁ

*Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
Zuzana.Bilkova@upce.cz*

Došlo 12.4.13, přijato 17.6.13.

Klíčová slova: antigen-vázající molekuly, kompaktní proteinové jádro, hypervariabilní smyčka, afinita

Obsah

1. Úvod
2. Historie vzniku alternativních antigen-vázajících molekul
3. Alternativní antigen-vázající molekuly
 - 3.1. Přehled a třídění antigen-vázajících molekul
 - 3.2. Vazebné proteiny afibody
 - 3.3. Vazebné proteiny s opakujícím se motivem
 - 3.4. Vazebné proteiny antikaliny
 - 3.5. Další alternativní antigen-vázající formáty
4. Závěr

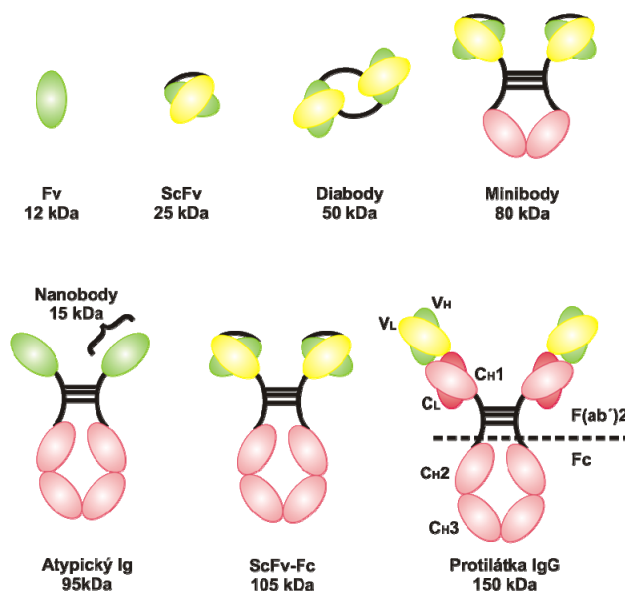
1. Úvod

Úroveň dnešních znalostí o molekulární podstatě mnoha chorob napomáhá vědcům i lékařům testovat nové způsoby terapie. Například již dnes v klinické praxi rozšířená biologická léčba, která spočívá mj. ve specifickém označení nebo cíleném zásahu určitých struktur spjatých s patologií, vede k jejich inaktivaci a/nebo efektivní eliminaci. Nutným předpokladem úspěchu však byla hybridomová technologie poprvé popsána Kohlerem a Milsteinem¹ v roce 1975, která umožnila vyrobit antigenně specifickou protilátku v dostatečném množství, kvalitě i čistotě. Záhy se objevily první práce popisující jejich uplatnění v diagnostice nebo v terapii některých závažných onemocnění. Tak vznikla ještě v 90. letech minulého století první generace bioterapeutik² včetně humanizovaných a chimérických protilátek, které se dodnes úspěšně v klinické praxi používají. Většinu těchto terapeutik tradiční doménové struktury bylo možné chemicky upravovat a měnit tak jejich užité vlastnosti³, např. rozpustnost, rozložitelnost, imunogenost nebo prostupnost tkáněmi. Další strukturální úpravy (např. fragmentace, kovalentní fúze, pegylace, glykosylace, konjugace s toxiny, enzymy, isotopy) jsou prováděny za jediným účelem: získat a vyrábět bezpečné molekuly pro humánní účely⁴.

Začátkem našeho století se v odborných časopisech objevují první články popisující nové molekuly označované jako alternativní antigen-vázající formáty⁵. Jedná se o molekuly funkčně protilátkám podobné, avšak strukturálně značně odlišné molekuly. Základní strukturu molekul netvoří polypeptidové řetězce typické doménové architektury, tak jak ji známe u klasických i neklasických formátů protilátek (obr. 1). Funkční molekula vychází ze stabilního nosného proteinu o malé molekulové hmotnosti⁶, jehož součástí je však i malý úsek se schopností specificky vázat cílovou strukturu. Očekává se, že takové proteiny budou vykazovat vyšší klinickou účinnost a bezpečnost pro pacienta. Negativní účinky spjaté s první generací látek, jako je toxicita nebo imunogenost, byly eliminovány. Navíc nelze pominout ekonomický efekt, neboť cena za jeden gram látky by měla být výrazně nižší než je tomu u dosud užívaných formátů.

2. Historie vzniku alternativních antigen-vázajících molekul

Díky hybridomové technologii bylo možné vyrábět ve velkém množství monoklonální protilátky požadované specifity i vlastností. Tyto biopolymerní molekuly odstartovaly novou éru nejen v diagnostice, ale velice brzy se



Obr. 1. Schématické znázornění doménové struktury protilátky IgG a jejích fragmentů spolu s uvedením molekulových hmotností. V_L, variabilní část lehkého řetězce (žlutá), V_H, variabilní část těžkého řetězce (zelená), C_L, konstantní část lehkého řetězce (růžová), C_H, konstantní část těžkého řetězce (vínová).

objevily i první odborné práce testující účinek těchto protilátek jako terapeutikum aplikované pacientům s nádorovým onemocněním⁷. Avšak zvířecí původ protilátek z důvodů nežádoucí imunitní reakce příjemce výrazně omezoval jejich využití v klinické praxi. Též náklady na výrobu až gramových množství protilátek byly vysoké. Chyběly levné expresní systémy savčího původu, které by současně zajišťovaly vhodné prostředí pro skládání polypeptidových řetězců do funkční formy spolu se všemi dodatečnými posttranslačními modifikacemi. Nežádoucí imunogenicita protilátek zvířecího původu byla odstraněna sestrojením tzv. chimérických nebo humanizovaných molekul, kdy byly zbytné části protilátek (Fc a konzervativní úseky Fab) nahrazeny fragmenty lidského původu⁸ (viz obr. 1). Antigen-specifické úseky zůstaly zachovány a poskytovaly reaktivitu s definovaným epitopem molekuly antigenu. Protilátky čistě zvířecího původu (např. myši Orthoclone-OKT3, myši Tositomumab – anti-CD20 protilátka), chimérické (např. Rituxan, Mabtera – anti-CD20 protilátky) nebo humanizované (např. Adalimumab – anti-TNF protilátka) se již více jak 15 let úspěšně používají v tzv. biologické léčbě nádorových nebo autoimunitních onemocnění⁹. V současné době je technologie výroby bioaktivních molekul, mezi něž protilátky samozřejmě patří, založena na rekombinantních technologiích využívajících bakteriální nebo kvasinkové expresní systémy. Avšak výtěžnost vysokomolekulárních imunoglobulinů byla a stále je ve srovnání s nízkomolekulárními proteiny nebo peptidy extrémně nízká. Řešením je integrovat do expresního vektoru jen kratší úseky DNA kódující pouze části molekuly a poté v kultivačním médiu zajistit reakční podmínky ke správnému skládání všech částí imunoglobulinu. Další možností bylo navrhnout molekuly obsahující pouze funkčně nezbytné části, které si však zachovávají svoji afinitu k cílové struktuře a jsou schopny vyvolat požadovaný efekt, tj. inaktivace či eliminace. A tak na přelomu století vzniká nová generace molekul založených pouze na vybraných fragmentech protilátek¹⁰. Díky vhodně zvoleným konstrukčním zásahům bylo možné u nich měnit vlastnosti, např. tkáňovou permeabilitu, rozpustnost, funkční afinitu, aviditu, vícevaznost, mono (-bi, -oligo) specifitu, degradovatelnost apod. Souhrnné informace o struktuře těchto molekul, jejich výrobě a uplatnění v klinické praxi lze najít v přehledném článku Plückerthuna a Packa⁸. V roce 1994 byl učiněn zajímavý objev¹¹. Zjistilo se, že se v séru velbloudů a lam nachází vedle klasických imunoglobulinů i funkční molekuly složené pouze ze dvou těžkých řetězců (obr. 1). Byl tak vyvrácen do té doby uznávaný předpoklad, že pro specifickou vazbu s antigenem se vždy musí párovat variabilní úseky lehkého a těžkého řetězce. Výzkum opakovaně potvrdil, že molekuly složené pouze z variabilní domény těžkého řetězce (VH) klasické savčí protilátky si i bez dimerizace s VL (variabilní doména lehkého řetězce) zachovávají svoji antigenní specifitu¹². Antigenně specifické části těchto alternativních imunoglobulinů se staly základem nových formátů označovaných v anglickém jazyce „nanobody“, v češtině bychom mohli použít termín nanolátky.

V tomto případě se jednalo o doposud nejmenší dostupnou intaktní antigen-vázající molekulu vycházející ze struktury imunoglobulinu. Zjistilo se však, že ve vodném prostředí jsou tyto fragmenty velice nestabilní, sorbují na povrchy a mají též tendenci vzájemně agregovat. Z pohledu praktického uplatnění v medicíně se tedy jednalo o slepou uličku. Komplikovaná architektura molekul, omezená dostupnost eukaryotních expresních systémů, časově i finančně náročný mutagenní a selekční systém. To vše jsou faktory, které významně brzdily a dodnes brzdí uplatnění rekombinantních protilátek nebo jejich fragmentů v klinické praxi. Alternativou se zdají být nové formáty antigen-vázajících molekul.

3. Alternativní antigen-vázající formáty

Znalost fenoménu, že pro specifickou interakci s antigenem stačí pouze jednofetězcový fragment VH, a též vyspělost technologií v 90. letech minulého století pomohly nasměrovat vývoj terapeuticky využitelných molekul kvalitativně novým směrem. Vědci zabývající se proteinovým inženýrstvím začali testovat nové vazebné proteiny, které však neměly s doménovou strukturou imunoglobulinů nebo jejich fragmentů nic společného. Molekuly jsou tvořeny relativně malým stabilním proteinem s konzervativní strukturou, v anglickém jazyce označovaným jako tzv. „scaffold“¹³. Kompaktní proteinová jádra často vycházejí ze struktury membránové vázaných receptorů na povrchu buněk. Součástí takových molekul však musí být i prostorově přístupný hypervariabilní úsek pro cílenou mutagenézi a interakci s antigenem. Tyto molekuly jsou základem pro konstrukci knihoven, tj. souboru značného množství variant lišících se v sekvencích aminokyselín v hypervariabilních úsecích polypeptidového řetězce. Z nich jsou pak pomocí účinných selekčních metod využívajících bakteriofágy¹⁴ nebo ribosomy¹⁵ izolovány molekuly s požadovanou specifitou příp. afinitou.

Jaké jsou na tyto nové formáty požadavky? Měly by to být robustní molekuly s menší molekulovou hmotností exprimovatelné v mikrobiálních buňkách. Základem struktury by tedy mělo být kompaktní proteinové jádro s krátkým hypervariabilním úsekem polypeptidového řetězce exponovaným na povrchu. Část polypeptidového řetězce tvořícího základ molekuly by si měla zachovat schopnost se samovolně sbalit a též si zachovat stabilní konformaci i po mutaci v oblasti smyčky¹³. Ani následná chemická modifikace by neměla konformaci a specifitu molekuly negativně ovlivnit. Další nutnou podmínkou je, že pro výběr molekul s požadovanou specifitou a afinitou musí existovat jednoduchý, rychlý a pokud možno levný selekční systém. Jedině tak lze získat molekuly specificky vázající vybraný antigen v dostatečném množství, čistotě a kvalitě. U výsledného produktu se kontroluje výtěžnost, specifita, afinita, termodynamická stabilita, rozpustnost spolu s chemickou stabilitou a rezistencí vůči proteasám. Struktura antigen-vázajících molekul se liší i podle účelu, k jakému jsou určeny⁴. Molekuly vhodné pro *in vivo* dia-

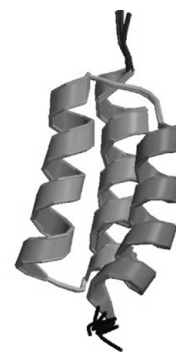
gnostiku by měly mít vysokou tkáňovou prostupnost s předvídatelnou tkáňovou distribucí; vysokou afinitu a specifitu k cílovým strukturám, která by neměla být ovlivněna finální chemickou modifikací¹⁶. Tyto malé molekuly s nízkou toxicitou a imunogenicitou by měly rychle dosáhnout cíle (zhruba do hodiny), ale současně by měly být relativně rychle z organismu vyloučeny (např. již za 4 hodiny)¹⁷. Oproti tomu molekuly s terapeutickým účinkem by měly být robustnější, stabilnější a odolnější vůči bakteriálnímu či enzymovému natrávení. Může se jednat o dimerní či trimerní formy výchozích kompaktních proteinových jader. Takové molekuly pak mohou nést radionuklidovou značku nebo i větší molekulu toxinu, cytostatika, antibiotika nebo cytokinu¹⁸. Jejich tkáňová prostupnost, afinita k cílové struktuře nebo dynamika specifické interakce by neměla být po chemické modifikaci významně narušena. Molekuly splňující všechna požadovaná kritéria jsou pak testovány jako potenciální bioterapeutika¹⁹.

3.1. Přehled a třídění antigen-vázajících molekul

V roce 2007 Skerra a spol.¹³ uvedli zajímavý přehled všech do té doby známých antigen-vázajících formátů, jejichž struktura nevycházela z tradiční doménové struktury imunoglobulinů. Jednalo se o velice heterogenní skupinu bioaktivních látek lišících se původem (lidský, zvířecí – hmyzí nebo savčí, rostlinný, bakteriální), uspořádáním (mono-multidoménové, mono-bi-multivalentní, mono-bimultispecifické) nebo strukturou proteinového jádra (fibronektinová doména III, lipokalin, thioredoxin, protein A, ankyrinový protein). Autoři použili jako základní třídící kritérium původ a strukturu molekuly skafoldu a nové antigen vázající formáty tak byly rozděleny do čtyř základních skupin: 1) nosný protein s jednou na povrchu exponovanou smyčkou na bázi krátkého peptidu (Kunitz domény, thioredoxin, cystin-knot motiv), 2) skafold s více smyčkami vytvářejícími souvislý povrch nebo povrch vytvořený částmi většího počtu hypervariabilních smyček (antikaliny, fibronektinová doména III), 3) formáty založené pouze na specifické sekundární struktuře (darpiny, afiliny), 4) oligomerní doménové formáty (avimery, tetranektiny).

3.2. Vazebné proteiny afibody

V roce 1997 byla švédskou biotechnologickou společností Affibody, AB (Stockholm, Švédsko) poprvé zkonstruována a strukturně popsána malá proteinová molekula s definovanou antigenní specifitou nesoucí na trhu označení „Affibody“®. Zadáním bylo snadno a levně vyrobit velké množství strukturně homogenních kopií robustního a stabilního proteinu o malé molekulové hmotnosti s definovanou afinitou k vybraným antigenním strukturám, které by mohly být bezpečně použity v diagnostice či terapii nádorových onemocnění. Základem nového formátu se stal malý inertní proteinový řetězec o velikosti 6 kDa, který pocházel ze stabilní konformace Z domény bakteriálního proteinu A (*Staphylococcus aureus*)²⁰. Molekula je



Obr. 2. Afibody, 3D struktura formátu o délce 58 aminokyselin se třemi α -helixy pocházející ze stabilní konformace Z domény stafylokokového proteinu A (SPA). Zdroj: <http://www.pdb.org>

tvořena jedním polypeptidovým řetězcem složeným z 58 aminokyselin a uspořádaným do struktury trojitého α -helixu (obr. 2). Jednořetězcový původ molekuly umožňuje její snadné a rychlé, na okolních podmínkách minimálně závislé, poskládání do nativní struktury. Vazebná specifita a afinita molekuly je dána náhodně vzniklou sestavou 13 většinou nepolárních aminokyselin exponovaných na povrchu 2 α -helixů. Konkrétně se jedná o část řetězce, kde původní Z-doména bakteriálního proteinu A vstupovala do vazby s Fc fragmentem IgG₁.

Místně-specifickou mutací bylo možné připravit látky s různou antigenní specifitou²¹. Výhodou bylo, že vzhledem k velikosti a jednoduchosti bylo možné vybrané molekuly množit a to buď klasickou syntézou peptidů na pevné fázi, nebo rekombinantní technologií v prokaryotním expresním systému, např. *Escherichia coli*. Absence cysteinů a disulfidických vazeb vedla k tomu, že se polypeptidový řetězec ihned spontánně a ireverzibilně skládá do vysoce stabilní struktury α -helixu. Molekula nevykazuje žádné jiné vedlejší efekty, např. proto, že nemá Fc fragment aktivující složky imunitního systému. Aby bylo možné prodloužit cirkulaci a zvýšit poločas eliminace (přeměny) účinné molekuly z organismu, byla molekula afibody navázána na 5 kDa fragment vazebné domény albuminu (Albumod™ technologie). Dnes se tyto látky testují nejen v terapii závažných onemocnění, diagnostice *in vivo* a *in vitro*²², ale též v oblasti biotechnologických a separačních procesů²³, např. pro afinitní purifikaci Taq DNA polymerasy nebo lidského apolipoproteinu A-1 (cit.²⁴). Molekuly v dimerní formě kovalentně vázané na nosič vykazovaly extrémně vysokou rezistenci vůči alkalickým roztokům, což významně prodlužuje životnost kolony a snižuje celkové náklady na purifikaci. Molekuly lze také použít k účinnému odstraňování nežádoucích látek z výchozích biologických materiálů (např. abundantní albumin nebo imunoglobuliny ze séra nebo plazmy, interferující proteiny z bakteriálního lyzátu, z fermentačního média)²⁵.

3.3. Vazebné proteiny s opakujícím se motivem

Mezi tzv. nové formáty patří různorodá skupina antigen-vázajících molekul, jejichž společným motivem jsou relativně malé, vícenásobně se opakující úseky polypeptidových řetězců²⁶. Odtud je také odvozen jejich anglický název, tzv. „repeat protein scaffolds“. Počáteční inspirací při konstrukci takových specifických molekul byly proteiny s vysokým podílem aminokyseliny leucinu, které u čelistnatců plní funkci přirozených protilátek, tak jak je dnes známe u savců. Jak uvádějí ve své přehledné práci Bowersma a Plückthun²⁷, bylo již popsáno více antigen-vázajících formátů s opakujícím se proteinovým motivem, např. ankyriny (AR), tetratrikopeptidové molekuly (TPR) nebo motiv Armadillo (ARM). Opakující se proteinové úseky jsou v průměru tvořeny 20–50 aminokyselinami, převládá strukturální motiv α -helixu, 2–3 α -helixy jsou vzájemně kovalentně propojené. Počet základních motivů se může měnit, přesto se molekuly stále efektivně skládají do nativní funkční formy a zachovávají si tandemový charakter, který jim udílí výjimečné vlastnosti (např. vysoká termostabilita, rezistence vůči proteolytickému štěpení nebo permeabilita buněčnou membránou, krevně mozgovou bariérou). Typickým zástupcem této skupiny jsou tzv. darpiny, o nichž pojednává následující kapitola.

Vazebné proteiny s opakujícím se ankyrinovým motivem

Základem těchto molekul je opakující se ankyrinový motiv²⁸, úsek o velikosti 3,5 kDa tvořený 33 aminokyselinami poskládanými do strukturálního motivu α -helix- β -ohyb- α -helix- β -vlásečka, kde je pouhých 7 aminokyselin variabilních. Poprvé byl popsán tento strukturální motiv u kvasinek, kde se proteiny s opakujícími se ankyrinovými motivy podílí na regulaci buněčného cyklu. V anglickém jazyce jsou tyto molekuly označovány zkratkou DARPin odvozené z názvu „designed ankyrin repeat protein“ První molekuly s motivy ankyrinu byly připraveny *in vitro* metodou inkluzních tělísek v roce 2002 (cit.²⁹). Práce publikovaná rok poté popisuje plně funkční molekulu, polypeptid s extrémně stabilním hydrofobním jádrem, který se díky hydrofilním *N*- a *C*-koncům polypeptidového řetězce dokáže rychle poskládat do funkční struktury bez vzniku agregátů ve vodných roztocích³⁰. Nové formáty takových molekul obsahují obvykle 4–6 opakování jednoho motivu. S délkou, tj. počtem opakování ankyrinového motivu, roste termostabilita a odolnost vůči denaturačním činidlům. Pro plnou denaturaci proteinu je nutná teplota 100 °C v prostředí 5M guanidium hydrochloridu. Jedná se o relativně malou molekulu o velikosti 14–21 kDa (v závislosti na celkovém počtu ankyrinových motivů), což přináší nesporné výhody vzhledem k jejich přípravě i možnému terapeutickému uplatnění (obr. 3). Schopnost se snadno poskládat do funkční molekuly umožňuje tyto molekuly syntetizovat v cytoplasmě prokaryotních expresních systémů (*Escherichia coli*) a to s výtěžností až 200 mg l⁻¹ kultivačního média. Také nezbytné izolační a purifikační kroky jsou díky vysoké stabilitě molekul v roztoku a jejich nulové tendenci agregovat výrazně usnadněny. Knihovna pro



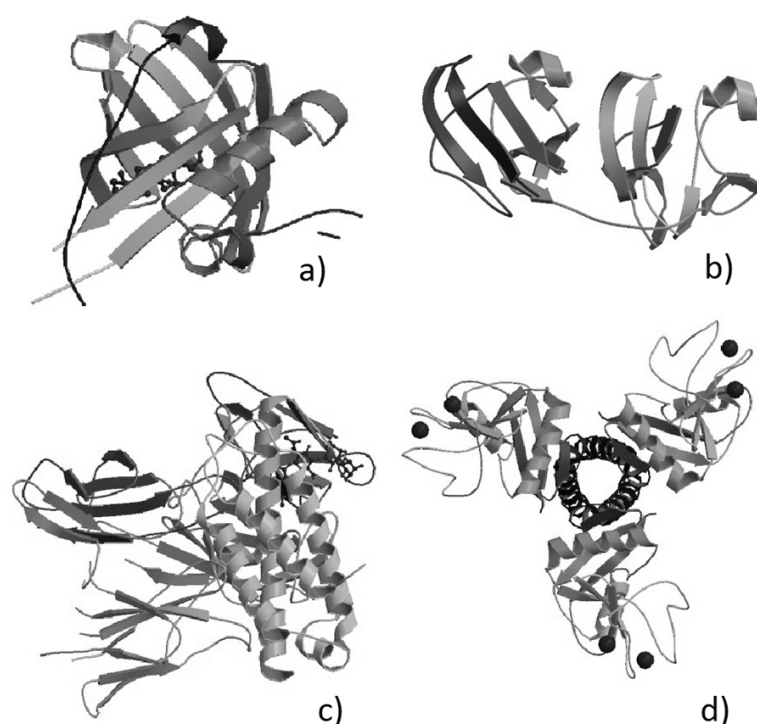
Obr. 3. DARPin: 3D struktura molekuly se specifitou proti β -řetězcům tubulinu (nejsou v komplexu). Zdroj: <http://www.pdb.org>

syntézu funkčních darpinových molekul dnes již obsahuje 229 základních ankyrinových motivů spolu s dalšími dvěma tisíci jejich chemických modifikací³¹. Molekuly lze snadno chemicky modifikovat¹⁶. Můžeme kovalentně vázat např. látku s cytotoxickým účinkem nebo nuklid, fluorescenční barvivo, toxiny, cytokiny, enzymové inhibitory, antagonisty ligandů, enzymy, aniž bychom ovlivnili vazebné vlastnosti molekuly.

3.4. Vazebné proteiny antikaliny

Do skupiny látek, kde kompaktní proteinové jádro nese více hypervariabilních smyček, jejichž na povrchu exponované části spolu vytváří vazebné místo, patří mimo jiné i antikaliny³². Molekuly vychází ze struktury přírodních látek, lipokalinů, hojně se vyskytujících jako transportní a zásobní proteiny u hmyzu. Lipokaliny na sebe přednostně vážou látky hydrofobní povahy, např. vitaminy, feromony a nízkomolekulární sekundární metabolity z prostředí. *In vitro* připravené antikaliny jsou tvořeny vysoce konzervovaným úsekem, centrálním β -skládaným listem sestaveným celkem z osmi antiparalelních řetězců, které tvoří podpůrnou kostru pro hypervariabilní úseky, konkrétně 4 smyčky (obr. 4). Monomerní forma antikalínu odpovídá svojí velikostí jednořetězcové formě variabilní části klasické protilátky (scFv, obr. 1). Stabilní struktura β -skládaného listu poskytuje molekulám vyšší odolnost vůči enzymovému štěpení. Bylo experimentálně potvrzeno, že záměna jedné nebo více aminokyselin, ať již v oblasti exponovaných smyček nebo i přímo v řetězci tvořícího β -skládaný list, zvyšuje specifitu a sílu vazby. V literatuře byly popsány funkční antikaliny hmyzího nebo savčího původu použité ke sledování mechanismu molekulového rozpoznávání mezi receptory a nízkomolekulárními ligandy³³, vazebné místo pro ligand je zanořené do základní proteinové struktury a je výrazně nepolární. Pomocí nukleární magnetické rezonance bylo prokázáno, že vazbou ligandu dochází ke stabilizaci úseku smyček i části β -skládaného listu.

Možnosti uplatnění antikalínů jsou široké, např. v oblasti diagnostiky či bioanalytické chemie, kde lze vyu-



Obr. 4. **3D struktury vybraných formátů:** a) antikalín DIGA16 v komplexu s digitoxigeninem, b) afilín vycházející ze struktury lidského γ B krystalinu, c) molekula andektinu v komplexu s IL-23, d) tetranektin, trimerní plasminogen-vázající protein s centrálně svinutou α -helikální strukturou. Zdroj: <http://www.pdb.org>

žit jejich schopností specificky rozpoznávat látky nízkomolekulární povahy. Antikaliny tak mohou být např. součástí biosenzorů nebo nosičů pro specifickou izolaci mnoha látek. Antikalín lze také použít vázaný v komplexu s alkalickou fosfatase jako specifický indikátor v mnoha analytických metodách. Zajímavou aplikací je využití antikalínů se specifitou proti fluoresceinu pro studium biofyzikálních jevů metodou založenou na principu fluorescenčního rezonančního přenosu (FRET)³⁴. Antikaliny lidského původu mohou blokovat negativní účinky cholesterolu, leukotrienů nebo bakteriálních lipopolysacharidů³⁵ nebo mohou být využity v protinádorové terapii³⁶.

3.5. Další antigen-vázající formáty

Do skupiny formátů, kde do interakce s antigenem vstupuje molekula svou sekundární strukturou, jako celek patří molekuly označované jako afiliny. Afiliny nemají konformačně flexibilní smyčky, které by vstupovaly do přímé interakce s ligandy, ale řízená mutagenese probíhá přímo v úseku β -skládaného listu sekundární struktury samotného skafoldu³⁷. Osm aminokyselin s exponovanými R-řetězci na jedné ze 4 β -struktur je variabilních. Cílenou mutagenesí právě v této oblasti lze vyrobit molekuly

s různou specifitou i afinitou. Takové molekuly se přednostně používají v bioafinitní chromatografii pro purifikaci a izolaci látek určených pro farmaceutický průmysl nebo pro účely terapeutické. Kompaktní struktura zajišťuje vysokou odolnost nosičů vůči vysokým teplotám, chemickou stabilitu za extrémních reakčních podmínek. Náplně lze používat opakovaně a je možné je také účinně sterilizovat.

Strukturálním motivem, jehož základem je proteinové jádro s jednou hypervariabilní smyčkou na povrchu, je malý protein označovaný jako tzv. Kunitzova doména. Název těchto molekul byl odvozen od strukturálního motivu o přibližné délce 30 aminokyselin, který se pravidelně objevuje u mnoha látek s inhibičním účinkem vůči běžným proteasám. První Kunitzovy domény³⁸ na bázi trypsinových inhibitorů pankreatu (BPTI) byly připraveny již v roce 1992. Terapeutický efekt těchto látek je přednostně blokační. Látky působí např. jako inhibitory nebo antagonisté extracelulárních proteas³⁹.

Do kategorie s vyšším počtem hypervariabilních smyček na povrchu se řadí molekuly nazývané adnektiny⁴⁰. Základní struktura těchto molekul vychází z běžně se vyskytujícího proteinu fibronektinu, konkrétně 10 kDa domény typu III, která svojí architekturou patří do klasické imunoglobulinové rodiny. Tepelně stabilní proteinové jádro

o celkové molekulové hmotnosti 94 kDa se skládá ze sedmi úseků β -skládaných listů spojených 2–3 vzájemně provázanými smyčkami. Výhodou je, že u těchto struktur chybí pro imunoglobuliny typická S-S vazba. Pro přípravu většího množství molekul lze tak použít levný a snadno dostupný bakteriální expresní systém. V literatuře již byla popsána příprava adnektinů se specifitou proti nádory nekrotizujícímu faktoru α (TNF α).

Formáty avimer (v anglické literatuře též označované „maxibody“) jsou uměle připravené multidoménné proteiny, kde je základním strukturálním motivem A-doména⁴¹. Jedná se o motiv, který je součástí receptorů pro lipoproteiny o nízké hustotě. Základní motiv je složený celkem z 35 aminokyselin, z nichž 2/3 jsou variabilní. Oligomerní nativní konformace se 4 smyčkami o celkové velikosti kolem 43 kDa je stabilizována třemi S-S vazbami a komplexem s vápenatými ionty Ca²⁺.

Tetranektiny jsou homotrimerní proteiny obsahující jako základní proteinový motiv lektinovou doménu typu C (CTLD)⁴². Strukturálně konzervované proteinové jádro domény nese polypeptidový řetězec ve tvaru smyčky, která vykazuje vysokou afinitu k cukerným strukturám. Cílenou mutagenézou byl připraven vysoce aviditní tetranektin, který efektivně neutralizoval účinek faktoru TNF α .

Cystin-knot miniproteiny⁴³ jsou tvořeny peptidovými řetězci o přibližné délce 25–35 aminokyselin s typickou terciární strukturou třech antiparalelních úseků β -skládaných listů stabilizovanou třemi S-S vazbami. Tyto vzájemně provázané části peptidového řetězce vytváří dohromady makrocyclickou strukturu „cystin-knot“ motivu se schopností specificky vázat molekuly různé chemické povahy.

Struktura thioredoxinu (TrxA), malého a robustního enzymu, se stala základem dalšího z řady antigen-vázajících formátů, tzv. peptidových aptamerů⁴⁴. Krátká sekvence tvořící aktivní místo enzymu (Cys-Gly-Pro-Cys) stabilizovaná S-S vazbou vytváří do vnějšího prostoru vysunutou smyčku o velikosti 108 kDa. Do této smyčky je možné bez negativního vlivu na stabilitu a funkčnost vkládat různé a různě dlouhé peptidy, které jsou cíleně vybrány z peptidové knihovny. Molekuly s definovanou specifitou lze vyrábět technologií inkluzních tělísek v cytosolu *Escherichia coli*.

4. Závěr

Cílem článku bylo poskytnout základní přehled a aktuální informace o původu, struktuře a způsobu výroby nových formátů antigen-vázajících molekul. Je pravdou, že specifické protilátky na bázi klasických imunoglobulinů nebo jejich *in vitro* připravené fragmenty nacházejí uplatnění v mnoha oborech, přesto při jejich výrobě nebo použití narážíme na některá strukturální a funkční omezení. Jako alternativu k těmto klasickým molekulám lze díky moderním metodám proteinového inženýrství připravit strukturálně odlišné molekuly, které si schopnost specificky vázat antigenní struktury zachovaly. První výsledky naznačují, že

tyto nové formáty mohou monoklonální protilátky v některých aplikacích úspěšně nahradit. Příklady antigen-vázajících molekul uvedené v článku potvrzují, že se jedná o látky s velkým potenciálem. Záměrem článku bylo upozornit na význam a velkou budoucnost těchto zajímavých molekul.

Tato práce byla financována z účelové podpory interního projektu SGFChT07/2014, projektu „Posílení excelentních týmů výzkumu a vývoje na Univerzitě Pardubice“, reg. č. CZ.1.07/2.3.00/30.0021 a podpořena grantovým projektem GA 206/12/0381.

Autorka děkuje RNDr. Šárce Růžičkové, Ph.D. za velice podnětné připomínky.

LITERATURA

1. Kohler G., Milstein C.: *Nature* 256, 495 (1975).
2. Hurler M. R., Gross M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 428 (1994).
3. Demarest S. J., Glaser S. M.: *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* 11, 675 (2008).
4. Hertler A. A., Frankel A. E.: *J. Clin. Oncol.* Dec. 7, 1932 (1989).
5. Nygren P. A., Skerra A.: *J. Immunol. Methods* 290, 3 (2004).
6. Hosse R. J., Rothe A., Power B. E.: *Protein Sci.* 15, 14 (2006).
7. Nadler L. M., Stashenko P., Hardy R., Kaplan W. D., Button L. N., Kufe D. W., Antman K. H., Schlossman S. F.: *Cancer Res.* 40, 3147 (1980).
8. Plückthun A., Pack P.: *Immunotechnology* 3, 83 (1997).
9. Waldmann, T. A.: *Nature Medicine* 9, 269 (2003).
10. Presta L. G.: *Curr. Opin. Immunol.* 20, 460 (2008).
11. Muyldermans S., Atarhouch T., Saldanha J., Barbosa J. A., Hamer R.: *Protein Eng.* 7, 1129 (1994).
12. De Genst E., Saerens D., Muyldermans S., Conrath K.: *Dev. Comp. Immunol.* 30, 187 (2006).
13. Skerra A.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 295 (2007).
14. Clackson T., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Winter G.: *Nature* 352, 624 (1991).
15. Rothe A., Hosse R. J., Power B. E.: *Expert Opin. Biol. Ther.* 6, 177 (2006).
16. Simon M., Zangemeister-Wittke U., Plückthun A.: *Bioconjug. Chem.* 23, 279 (2012).
17. Miao Z., Levi J., Cheng Z.: *Amino Acids* 41, 1037 (2011).
18. Wurch T., Pierré A., Depil S.: *Trends Biotechnol.* 30, 575 (2012).
19. Friedman M., Stáhl S.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 53, 1 (2009).
20. Eklund M., Axelsson L., Uhlén M., Nygren P. A.: *Proteins* 48, 454 (2002).
21. Feldwisch J., Tolmachev V.: *Methods Mol. Biol.* 899, 103 (2012).
22. Tolmachev V., Tran T. A., Rosik D., Sjöberg A., Abrahamsén L., Orlova A.: *J. Nucl. Med.* 53, 953

- (2012).
23. Löfblom J., Feldwisch J., Tolmachev V., Carlsson J., Ståhl S., Frejd F. Y.: *FEBS Lett.* 584, 2670 (2010).
 24. Nord K., Gunneriusson E., Uhlén M., Nygren P. A.: *J. Biotechnol.* 80, 45 (2000).
 25. Grönwall C., Sjöberg A., Ramström M., Höidén-Guthenberg I., Hober S., Jonasson P., Ståhl S.: *Biotechnol. J.* 2, 1389 (2007).
 26. Stumpp M. T., Binz H. K., Amstutz P.: *Drug Discovery Today* 13, 695 (2008).
 27. Boersma Y. L., Plückthun A.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 849 (2011).
 28. Hollenbeck J. J., Danner D. J., Landgren R. M., Rainbolt T. K., Roberts D. S.: *Biomacromolecules* 13, 1996 (2012).
 29. Mosavi L. K., Minor D. L. Jr., Peng Z. Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 16029 (2002).
 30. Binz H. K., Stumpp M. T., Forrer P., Amstutz P., Plückthun A.: *J. Mol. Biol.* 12, 489 (2003).
 31. Tamaskovic R., Simon M., Stefan N., Schwill M., Plückthun A.: *Methods Enzymol.* 503, 101 (2012).
 32. Skerra A.: *J. Biotechnol.* 74, 257 (2001).
 33. Mills J. L., Liu G., Skerra A., Szyperski T.: *Biochemistry* 48, 7411 (2009).
 34. Vopel S., Mühlbach H., Skerra A.: *Biol. Chem.* 386, 1097 (2005).
 35. Skerra A.: *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9, 336 (2007).
 36. Hohlbaum A. M., Skerra A.: *Expert Rev. Clin. Immunol.* 3, 491 (2007).
 37. Ebersbach H., Fiedler E., Scheuermann T., Fiedler M., Stubbs M. T., Reimann C., Proetzel G., Rudolph R., Fiedler U.: *J. Mol. Biol.* 372, 172 (2007).
 38. Roberts B. L., Markland W., Siranosian K., Saxena M. J., Guterman S. K., Ladner R. C.: *Gene* 121, 9 (1992).
 39. Lehmann A.: *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, 1187 (2008).
 40. Lipovsek D.: *Protein Eng., Des. Sel.* 24, 3 (2011).
 41. Silverman J., Liu Q., Bakker A., To W., Duguay A., Alba B. M., Smith R., Rivas A., Li P., Le H., Whitehorn E., Moore K. W., Swimmer C., Perloth V., Vogt M., Kolkman J., Stemmer W. P.: *Nat. Biotechnol.* 23, 1556 (2005).
 42. Kolmar H.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10, 361 (2010).
 43. Craik, D. J., Daly, N. L., Bond, T., and Waite, C.: *J. Mol. Biol.* 294, 1327 (1999).
 44. Geyer C. R.: *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 24, 4 (2001).

Z. Bílková (*Department of Biochemical and Biological Sciences, University of Pardubice*): **New Formats of Antigen-Binding Molecules**

Hybridoma technology for synthesis of monoclonal antibodies was one of the major breakthroughs in biotechnology of the 20th century. Since then, it has been possible to produce the specific molecules with typical immunoglobulin domain structure in sufficient quantities and quality. So far the synthesis of these complex molecules is labour-intensive and highly expensive. Also the non-human origin of immunoglobulins limits their application in clinical practice. These circumstances led to the development of new formats of antigen-binding molecules. The main goal was to prepare simple and stable low-molecular-weight substances, which can be utilized not only in analytical chemistry, in separation science but also as diagnostics or therapeutics. Molecules with compact protein core (scaffold) with exposed hypervariable loops on the surface show a possible direction of efforts. Recently, very promising antigen-binding formats such as Affibody, DARPins, Affilins or Anticalins were tested not only for their diagnostic or therapeutic potentials, but also in analytical chemistry as highly specific ligands for isolation and purification of bioactive molecules, e.g. for affinity chromatography. The classification, origin and structure of new antigen-binding molecules with some examples of their applications are described.