

Biochemie 2009

Arne Skerra, Michaela Gebauer, Achim Wagenknecht, Volker Sieber, Ulrich Kettling

Durch Scaffold-Engineering lassen sich neuartige Bindungsproteine konstruieren. Die sich kontinuierlich verbessernden Methoden des Enzymengineerings erzeugen neuartige Enzyme für effiziente biotechnische Prozesse in der Industrie. Neue Methoden zur Modifizierung mit reaktiven Gruppen oder Sonden ermöglichen die synthetische Funktionalisierung von Nukleinsäuren.

Proteindesign mit Scaffolds

◆ Seit der Entwicklung von Verfahren zur Biosynthese von Antikörperfragmenten in *Escherichia coli* und der Klonierung von Genbibliotheken sowie deren funktioneller Selektion hat die Antikörper-Biotechnologie eine hohe Anwendungsreife erlangt. Inzwischen versprechen alternative Protein-Scaffolds, Antikörper einer dritten Generation zu liefern. Die Konstruktion und Anwendung solcher neuartiger Bindungsreagenzien für die medizinische Therapie und das In-vivo-Imaging von Tumorerkrankungen brachte im vergangenen Jahr weitere Fortschritte.

Antikörper: ein Erfolgsbeispiel

◆ Seit den Arbeiten von Paul Ehrlich¹⁾ war die Chemotherapie von enormer Bedeutung für die Medizin im 20. Jahrhundert. Allerdings ist die Zahl der neu zugelassenen chemisch-synthetischen Arzneimittel in den letzten Jahren zurückgegangen. Dagegen finden Biopharmazeutika, d. h. insbesondere Antikörper und andere therapeutische Proteine, zunehmend Eingang in die Klinik.²⁾

Antikörper lassen sich relativ leicht generieren, entweder durch Immunisierung von Tieren (erste Generation) oder – seit den 1990er

Jahren – durch In-vitro-Selektion aus klonierten Immunglobulin-Genbibliotheken (zweite Generation).³⁾ Darüber hinaus sind diese Proteine außerordentlich spezifisch für ihre krankheitsrelevanten Zielmoleküle, also Zelloberflächenrezeptoren, Signalmoleküle oder Wachstumsfaktoren; und mit ihren Affinitäten, deren K_D -Werte im nano- bis picomolaren Bereich liegen, übertreffen sie die meisten konventionellen Arzneimittel bei weitem.

Mit zunehmender Anwendung sind allerdings auch Nachteile der Antikörper offenbar geworden. So ist ihre biotechnische Herstellung zeitaufwendig und teuer, da sie sehr komplex aus vier unterschiedlichen Polypeptidketten, einschließlich essenzieller Disulfidbrücken und Glycosylierung, zusammengesetzt sind. Dies hat die Suche nach alternativen Bindungsreagenzien mit günstigeren praktischen Eigenschaften stimuliert: zunächst Antikörperfragmente mit immer geringerer Größe – Fab-Fragmente, Single-Chain-Fv-Fragmente – und zuletzt gar einzelne variable Immunglobulindomänen, bekannt geworden als Domain Antibodies (dAbs) oder Nanobodies (aus Kamelelen).⁴⁾ Mit der fortschreitenden Technik zur Manipulation und Selektion von rekombinanten Antikörpern (durch Phage Display usw.) sowie deren Fragmenten entstand darüber hinaus auch die Idee des Engineerings

gänzlich anderer Protein-Scaffolds für Zwecke spezifischer Bindung.⁵⁾

Voraussetzung hierfür ist eine rigide und kompakte Proteinstruktur (also der eigentliche Scaffold) mit nachweislich stabiler Faltung, welche in ihrer Aminosäuresequenz variierebare Abschnitte aufweist, ähnlich der Rolle der Complementarity Determining Regions (CDRs) in den Antikörpern.³⁾ Potenziell geeignete Proteindomänen finden sich durchaus in der Natur. Aber erst das kombinatorische Proteindesign, also die Herstellung von Proteinbibliotheken durch gezielte Zufallsmutagenese im aktiven Zentrum, kombiniert mit effizienten Selektions- und Screening-Methoden, hat den erfolgreichen Einsatz solcher Scaffolds mit neuartigen Antigen- bzw. Target-Bindungsstellen möglich gemacht.

Alternative Proteingerüststrukturen

◆ Brauchbare Scaffolds haben sich vor allem unter kleinen und robusten löslichen Proteinen gefunden, z. B. in den Familien der Kunitz-Proteaseinhibitoren⁶⁾ oder der Lipocaline,⁷⁾ außerdem in den stabil gefalteten Extramembranregionen von Zelloberflächenrezeptoren wie Protein A,⁸⁾ Fibronectin⁹⁾ oder den Ankyrin-Repeat-Proteinen.¹⁰⁾ Verglichen mit Antikörpern oder ihren Fragmenten bieten solche alternative Scaffolds

Vorteile für die Anwendung, unter anderem aufgrund erhöhter Faltungsstabilität, effizienter Produktion in *E. coli* oder der Möglichkeit zur Ausstattung mit zusätzlichen Effektorfunktionen in Form von gentechnisch gekoppelten Fusionsproteinen. Daneben spielt für die aktuelle Popularität von Scaffolds in der Biotech- und Pharmaindustrie¹¹⁾ auch die Unabhängigkeit von Antikörper-Schutzrechten eine Rolle.

Inzwischen sind mehr als 50 verschiedene Gerüststrukturen zur Generierung neuartiger Bindungsproteine vorgeschlagen worden¹²⁾ – einschließlich so exotischer Scaffolds wie des grün fluoreszierenden Proteins.¹³⁾ Darunter befinden sich jedoch auch zahlreiche Eintagsfliegen, bei denen gerade einmal eine neue Bindungsspezifität demonstriert worden ist. Allmählich konsolidiert sich dieses Forschungsgebiet jedoch, wobei sich die folgenden Scaffolds als besonders vielversprechend erwiesen haben: Designer-Kunitz-Domänen, Affibodies, Adnectins/Monobodies, Anticaline, DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins) sowie Cysteinknoten-Peptide¹⁴⁾ und, wenn man den Kreis entsprechend erweitert, die dAbs und Nanobodies.¹⁵⁾

Die wohl ersten erfolgreichen Beispiele für Protein-Scaffolds bieten die Kunitz-Domänen, insbesondere der menschliche Proteaseinhibitor LACI-D1, der zur Konstruktion neuartiger Bindungsproteine verwendet wurde.⁶⁾ Daraus resultierten allerdings hauptsächlich Proteaseinhibitoren mit neuer Spezifität, was die Anwendungsbreite dieser Proteingruppe einschränkt. Immerhin haben die schon aus den 1990er Jahren stammenden künstlichen Inhibitoren DX-88 und DX-890 mittlerweile vielversprechende Resultate in der klinischen Prüfung gezeigt (s. u.).

Eine gewisse Verwandtschaft zu diesem Protein-Scaffold zeigen die Cysteinknoten-Peptide aus nur etwa 30 Aminosäuren. Sie sind durch typischerweise drei Disulfidbrücken in ihrer Konformation stabilisiert und fungieren ebenfalls häufig als Proteaseinhibitoren.¹⁴⁾ Besonders

vielversprechend erscheint der pflanzliche Trypsininhibitor EETI-II, auf dessen Grundlage kürzlich Peptidliganden für Integrine¹⁶⁾ und für den Wachstumsfaktor VEGF-A¹⁷⁾ entwickelt wurden.

Adnectine (auch als Monobodies bezeichnet) leiten sich von der zehnten extrazellulären Typ-III-Domäne des menschlichen Fibronectins ab (¹⁰Fn3).⁹⁾ Diese zeigt eine stabile

β-Sandwich-Faltung ähnlich den Immunglobulinen, mit drei Schleifen an den zu CDRs analogen Stellen, wobei die Abwesenheit einer Disulfidbrücke demgegenüber einen Vorteil darstellt. Ein erstes Adnectin ist derzeit in klinischer Prüfung (s. u.). Zuletzt wurde durch mRNA-Display ein für das SARS-CoV Nucleocapsid-Protein spezifisches ¹⁰Fn3-basiertes Bindungsprotein selektiert.¹⁸⁾ →

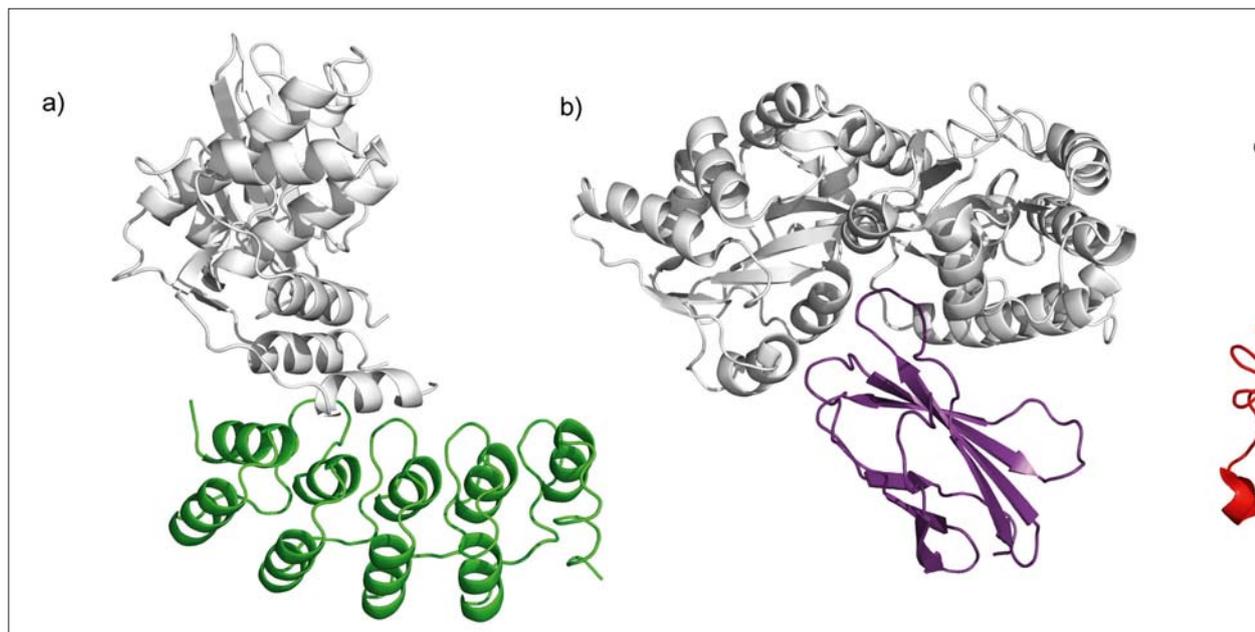


Abb. 1. Vier Beispiele von alternativen Bindungsproteinen, für die Kristallstrukturen im Komplex mit Zielproteinen bekannt sind: a) DARPin im Komplex mit APH (PDB code 2BKK); b) Monobody im Komplex mit MBP (2OBG); c) Anticalin im Komplex mit CTLA-4 (3BX7); d) Affibody im Komplex mit der Original-Z-Domäne von Protein A (1LP1). Die unterschiedlichen Scaffolds sind jeweils farbig hervorgehoben.

Die Gerüststruktur der Affibodies geht auf die Z-Domäne eines Oberflächenproteins von *Staphylococcus aureus* zurück, das Protein A.⁸⁾ Dessen Dreihelixbündel-Struktur bildet eine Bindungsstelle – ursprünglich für den Fc-Teil von Antikörpern – vermittelt durch Seitenketten, die von zwei benachbarten α -Helices ausgehen. Durch deren Variation lassen sich neuartige Bindungsproteine selektieren, beispielsweise gegen den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α).¹⁹⁾

Der modulare Aufbau eines DAR-Pins basiert typischerweise auf zwei

bis drei wiederholten β -Haarnadel/ α -Helixdimer-Einheiten flankiert von zwei endständigen Modulen.¹⁰⁾ Sowohl die Seitenketten an deren Oberfläche als auch – zumindest im Prinzip – die Anzahl an sich wiederholenden Einheiten können variiert und damit Bindungsspezifitäten im nanomolaren Bereich erreicht werden. Jüngste Beispiele sind durch Ribosomal Display selektierte DARPin gegen IgE-Fc ϵ -RI²⁰⁾ und das Oberflächenprotein eines *Lactococcus*-Bakteriophagen.²¹⁾

Die Konstruktion der Anticaline geht von den Lipocalinen aus, einer weitverbreiteten Familie von kleinen robusten Proteinen, die natürlicherweise zur Speicherung oder dem Transport von Vitaminen, Hormonen und Sekundärmetaboliten dienen, unter anderem in den menschlichen Körperflüssigkeiten.⁷⁾ Ihre β -Fassstruktur öffnet sich an einem Ende zu einer kelchförmigen Bindungstasche, die von vier strukturell variablen Schleifen gebildet wird. Randomisierung der dort angeordneten Aminosäuren und Selektion führt zu Anticalinen, die nicht nur kleine Liganden erkennen können – beispielsweise einen Y^{3+} -DTPA-Komplex²²⁾ – sondern auch Protein-Zielstrukturen mit Affinitäten bis in den picomolaren Bereich binden – z. B. die extrazellu-

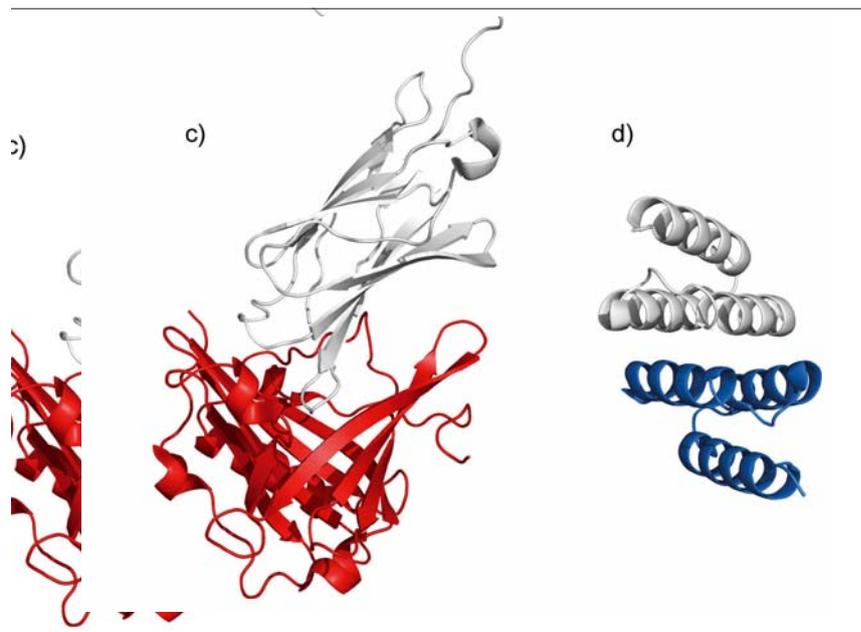
läre Domäne des T-Zelloberflächenrezeptors CTLA-4.²³⁾

Prinzipien der molekularen Erkennung

◆ Für den (Bio)-Chemiker interessant sind vor allem die strukturellen Mechanismen, mit denen die künstlichen Bindungsproteine ihre Targets erkennen. Durch hochkomplementäre Passform bei ausreichend großer Proteinoberfläche, die im Komplex begraben wird, lassen sich äußerst niedrige Dissoziationskonstanten (nM bis pM) erzielen, wobei für praktische Anwendungen neben der hohen Affinität meist auch eine langsame Dissoziationskinetik von Bedeutung ist.

Die meisten alternativen Scaffolds zeigen dabei Bindungsmechanismen, die von denen der mittlerweile wohlverstandenen Antikörperbindungsstellen abweichen: Dort ergeben insgesamt sechs hypervariable Schleifen eine zusammenhängende Proteinoberfläche, die zu praktisch jeder vorgegebenen Molekülstruktur eine komplementäre Form ausbilden kann. Neben der Variation der Aminosäureseitenketten spielen unterschiedliche Rückgrat-Konformationen sowie teilweise eine induzier-





te strukturelle Anpassung bei der Komplexbildung mit dem Antigen eine Rolle für die hohe erzielbare Bindungsaffinität.³⁾

Diejenigen Protein-Scaffolds, welche selbst der Immunglobulin-Superfamilie angehören, also die Adnectine und die oben genannten dAbs und Nanobodies, profitieren naturgemäß von analogen Mechanismen. Allerdings sind in diesen Fällen bloß zwei bis drei Schleifen an der Bindungsstelle beteiligt; deren Anordnung an einem Ende eines β -Sandwich führt dabei zu einer insgesamt keilförmigen Molekülgestalt (Abbildung 1). Von diesen Bindungsproteinen werden daher oft konkave Regionen in den Antigenen angesteuert, z. B. die aktiven Zentren von Enzymen.²⁴⁾

Im Gegensatz dazu ist die Fähigkeit zur strukturellen Adaptation für Bindungsproteine, deren Bindungsstellen auf rigiden Sekundärstrukturen basieren, gering. Dies ist der Fall für die Affibodies und die DARPins. Aufgrund ihrer strukturellen Rigidität wurden DARPins mit geeigneter Spezifität als Hilfsmittel zur Kristallisation von flexibleren Proteinen vorgeschlagen. Dabei war sogar zu beobachten, dass jene sich bei der Komplexbildung anpassen, wohingegen die DARPins stets starr ver-

bleiben.²⁵⁾ Interessanterweise zeigen die Affibodies zwar ebenfalls eine konservierte Konformation, allerdings scheint diese keine allzu hohe thermodynamische Stabilität zu besitzen: Teilweise nehmen Affibodies erst in Gegenwart des Zielmoleküls ihre Faltung an,²⁶⁾ oder sie falten sich gar, wie jüngst am Beispiel eines Amyloid- β -Peptids zu sehen, zu einer atypischen Topologie um.²⁷⁾

Demgegenüber nehmen die Anticaline eine besondere Stellung ein. Obwohl der Lipocalin-Scaffold nicht mit den Immunglobulinen verwandt ist, zeigen die vier Peptidschleifen, welche die Bindungstasche bilden, schon innerhalb der natürlichen Proteinfamilie eine hohe strukturelle Variabilität, sowohl was die Aminosäuresequenzen als auch die Länge und Konformation der einzelnen Segmente betrifft. Zwei Kristallstrukturen von Anticalinen, die gegen einen niedermolekularen Liganden bzw. ein Protein gerichtet sind, illustrieren, dass sich dieses Prinzip auch in den künstlichen Anticalinen fortsetzt:^{22, 23)} Nicht nur die Gestalt der Bindungstasche insgesamt ändert sich dabei infolge des Austauschs von bis zu 20 Aminosäuren; zumindest im Fall des Protei-

nantigens war sogar ein Induced Fit zu beobachten, ganz ähnlich wie bei Antikörpern.

Perspektiven für die medizinische Anwendung

◆ Alternative Gerüststrukturen werden derzeit vor allem für den medizinischen Einsatz entwickelt. Einer der Gründe dafür liegt in der Hoffnung auf lohnende Erträge im Gegenzug zu der noch jungen und damit relativ teuren Technologie. Interessante Anwendungen ergeben sich vor allem in Verbindung mit biomedizinischen Mechanismen, bei denen eine Aktivierung des Immunsystems nicht nötig oder erst gar nicht erwünscht ist. Attraktiv sind Bindungsproteine dementsprechend als Antagonisten von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen oder als Enzyminhibitoren. So sind die neuartigen Kunitz-Inhibitoren DX-88 (Ecallantide) und DX-890 (EPI-hNE4) als spezifische Blocker der Proteinase Kallikrein²⁸⁾ bzw. Neutrophilen-Elastase²⁹⁾ in fortgeschrittener klinischer Prüfung zur Behandlung des erblichen Angioödems (HAE) bzw. der cystischen Fibrose.

Vielversprechende Krankheitsstargets bieten auch die extrazellulären Domänen von Membranrezeptoren. So wurde das Adnectin CT-322 (Angiocept) als Antagonist gegen den VEGF-Rezeptor 2 entwickelt, der das Andocken des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) verhindert und dadurch die Tumorigenese inhibiert.³⁰⁾ Das Adnectin, welches zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit mit Polyethylenglycol chemisch gekoppelt ist, befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Prüfung zur Behandlung von Glioblastoma multiforme. Umgekehrt können Protein-Scaffolds auch gegen VEGF selbst gerichtet sein und so dessen Rezeptorbindung verhindern. So soll das Anticalin PRS-050 im Frühjahr 2010 in die klinische Prüfung zur Behandlung solider Tumore gehen,³¹⁾ während das DARPIn MP0112 für klinische Studien zur Behandlung von Augenkrankungen vorgesehen ist, wo

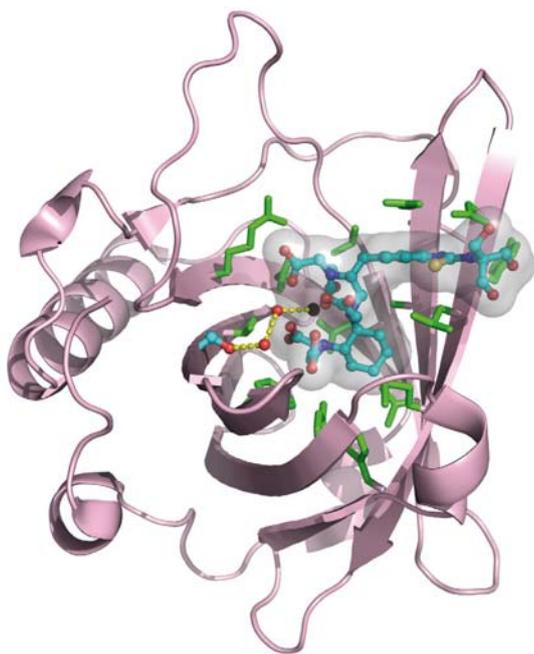


Abb. 2. Kristallstruktur (3DSZ) eines Anticalins (rosa, mit grün hervorgehobenen Kontaktseitenketten) im Komplex mit Y^{3+} (schwarz) nach Chelatisierung mit einem DTPA-Derivat ($[(R)-2\text{-amino-3-(4\text{-isothiocyanatophenyl})propyl]-trans-(S,S)\text{-cyclohexan-1,2-diamin-pentaessigsäure} \cdot 3HCl]$), hier als Addukt mit Trishydroxymethylaminomethan; C hellblau, O rot, N blau, S gelb). Blick von schräg oben in das sich kelchförmig erweiternde β -Fass. Das Anticalin erkennt auch andere Lanthanide in DTPA-gebundener Form mit Dissoziationskonstanten im Bereich nM bis pM.

Michaela Gebauer, Jahrgang 1981, schließt zurzeit ihre Doktorarbeit auf dem Gebiet der Anticalinforschung am Lehrstuhl für Biologische Chemie an der TU München ab. Sie studierte in Halle (Saale) Biochemie und fertigte am dortigen Institut für Biotechnologie unter Leitung von Rainer Rudolph ihre Diplomarbeit an. **Arne Skerra**, Jahrgang 1961, ist Lehrstuhlinhaber für Biologische Chemie an der TU München. Seit dem Jahr 2007 ist er Sprecher der Fachgruppe Biochemie der GDCh. Er studierte Chemie in Darmstadt und München, nach seiner Promotion am Gen-Zentrum der LMU München arbeitete er am Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, England. Anschließend baute er eine Arbeitsgruppe am MPI für Biophysik in Frankfurt auf. 1994 nahm er einen Ruf an die TU Darmstadt auf die Professur für Proteinchemie an. 1998 wechselte er an die TU München. Sein Forschungsgebiet ist das Design und die Strukturanalyse von Proteinen. skerra@wzw.tum.de



ebenfalls unerwünschtes Blutgefäßwachstum gebremst werden soll.³²⁾

Noch bessere Wirkung in der Tumorthherapie verspricht man sich von neuen Bindungsproteinen, die gegen Zelloberflächenmarker gerichtet und mit toxischen Funktionen versehen sind, beispielsweise durch Kopplung mit Giftstoffen oder durch gentechnische Fusion mit Enzymen, welche Prodrugs aktivieren. Angesichts der aufwendigen Konstruktion solcher Verbundwirkstoffe sind diese Ansätze noch wenig entwickelt. Vielversprechend erscheint dagegen bereits die Kopplung von Protein-Scaffolds mit Radionukliden, die je nach Auswahl der Strahlungsart für diagnostische Zwecke eingesetzt werden können (In-vivo-Imaging) oder zur Radioimmuntherapie (RIT) nutzbar sind. Der Affibody ABY-025, der den Brustkrebs-Marker Her2 erkennt, ist derzeit in klinischer Prüfung für die bildgebende Tumordiagnostik.³³⁾

Gegenüber Antikörpern haben die kleinen Protein-Scaffolds den Vorteil der schnelleren Nierenausscheidung aus dem Plasma und dadurch der besseren Tumorkontrastgebung; für den Affibody kommt hinzu, dass dieser die relativ drastischen Bedingungen zur chemischen Kopplung mit einem Chelator und dessen Beladung mit dem Radionuklid relativ gut übersteht. Dies gilt aber vermutlich nicht für alle Bindungsproteine, die aufgrund ihrer tumorspezifischen Bindungsfunktion für derlei Anwendungen in Frage kommen. Einen Ausweg könnte hierbei die gentechnische Fusion mit einem Anticalin bieten,²²⁾ welches einen $Y^{3+} \cdot DTPA$ -Komplex mit hoher Affinität und schneller Kinetik nicht-kovalent in seiner Bindungstasche aufnimmt und so ein nuklearmedizinisch relevantes Lanthanid an den Tumor fixieren kann (Abbildung 2).

Literatur

- 1) F. Bosch, L. Rosich, *Pharmacology* 2008, 82, 171.
- 2) J.M. Reichert, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008, 9, 423.
- 3) A. Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003, 7, 683.
- 4) P. Holliger, P.J. Hudson, *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 1126.
- 5) A. Skerra, *J. Mol. Recognit.* 2000, 13, 167.
- 6) A. E. Nixon, C. R. Wood, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2006, 9, 261.
- 7) A. Skerra, *FEBS J.* 2008, 275, 2677.
- 8) P.-Å. Nygren, *FEBS J.* 2008, 275, 2668.
- 9) L. Bloom, V. Calabro, *Drug Discov. Today* 2009, 14, 949.
- 10) M. T. Stumpp, H. K. Binz, P. Amstutz, *Drug Discov. Today* 2008, 13, 695.
- 11) C. Sheridan, *Nat. Biotechnol.* 2007, 25, 365.
- 12) H. K. Binz, P. Amstutz, A. Plückthun, *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 1257.
- 13) T. V. Pavoov, Y. K. Cho, E. V. Shusta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 11895.
- 14) H. Kolmar H., *FEBS J.* 2008, 275, 2684.
- 15) M. Gebauer, A. Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, 13, 245.
- 16) R. H. Kimura, A. M. Levin, F. V. Cochran, J. R. Cochran, *Proteins* 2009, 77, 359.
- 17) H. J. Chang, H. J. Hsu, C. F. Chang, H. P. Peng, Y. K. Sun, H. M. Yu, H. C. Shih, C. Y. Song, Y. T. Lin, C. C. Chen, C. H. Wang, A. S. Yang, *Structure* 2009, 17, 620.
- 18) H. I. Liao, C. A. Olson, S. Hwang, H. Deng, E. Wong, R. S. Baric, R. W. Roberts, R. Sun, *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 17512.
- 19) A. Jonsson, H. Wallberg, N. Herne, S. Stahl, F. Y. Frejd, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2009, 54, 93.
- 20) A. Eggel, M. J. Baumann, P. Amstutz, B. M. Stadler, M. Vogel, *J. Mol. Biol.* 2009, 393, 598.
- 21) D. Veessler, B. Dreier, S. Blangy, J. Lichiere, D. Tremblay, S. Moineau, S. Spinelli, M. Tegoni, A. Plückthun, V. Campanacci, C. Cambillau, *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 30718.
- 22) H. J. Kim, A. Eichinger, A. Skerra, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 3565.
- 23) D. Schönfeld, G. Matschiner, L. Chatwell, S. Trentmann, H. Gille, M. Hülsmeier, N. Brown, P. M. Kaye, S. Schlehüber, A. M. Hohlbaum, A. Skerra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 8198.
- 24) E. De Genst, K. Silence, K. Decanniere, K. Conrath, R. Loris, J. Kinne, S. Muylderms, L. Wyns, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 4586.
- 25) G. Sennhauser, M. G. Grütter, *Structure* 2008, 16, 1443.
- 26) E. Wahlberg, C. Lendel, M. Helgstrand, P. Allard, V. Dinckas-Renqvist, A. Hedqvist, H. Berglund, P. Å. Nygren, T. Hård, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 3185.
- 27) W. Hoyer, C. Grönwall, A. Jonsson, S. Ståhl, T. Hård, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 5099.
- 28) A. Lehmann, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008, 8, 1187.
- 29) S. Attucci, A. Gauthier, B. Korkmaz, P. Delepine, M.F. Martino, F. Saudubray, P. Diot, F. Gauthier, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006, 318, 803.
- 30) S. P. Dineen, L. A. Sullivan, A. W. Beck, A. F. Miller, J. G. Carbon, R. Mamluk, H. Wong, R. A. Brekken, *BMC Cancer* 2008, 8, 352.
- 31) www.pieris-ag.com
- 32) www.molecularpartners.ch
- 33) V. Tolmachev, *Curr. Pharm. Des.* 2008, 14, 2999.