

# Glikozilacija terapeutskih proteina

---

**Galić, Hrvoje**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2012**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:244346>

*Rights / Prava:* [In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI CI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**GLIKOZILACIJA TERAPEUTSKIH PROTEINA**

**GLYCOSYLATION OF THERAPEUTIC PROTEINS**

**SEMINARSKI RAD**

Hrvoje Gali  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: doc. dr. sc. Ita Grui -Sovulj

Zagreb, 2012.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>2</b>
<b>2. GLIKOZILACIJA PROTEINA .....</b>	<b>8</b>
2.1. <i>N</i> -GLIKOZILACIJA .....	10
2.2. <i>O</i> -GLIKOZILACIJA .....	12
<b>3. TERAPEUTSKI PROTEINI.....</b>	<b>14</b>
3.1 EKSPRESIJSKI SUSTAVI I PROIZVODNJA TERAPEUTSKIH PROTEINA .....	15
3.2. ÉRITROPOETIN – PRVI TERAPEUTSKI PROTEIN.....	17
<b>4. GLIKOINŽENJERING.....</b>	<b>20</b>
4.1. GLIKOOPTIMIZACIJA.....	21
4.2. PRIMJENA GLIKOINŽENJERINGA I TERAPIJE ZAMJENE ENZIMA PRI LIJE GAUCHEROVE BOLESTI .....	24
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>26</b>
<b>6. SAŽETAK.....</b>	<b>28</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>29</b>

## 1. UVOD

Glikozilacija je najsloženiji oblik procesiranja novonastalih proteina i nužan za uspostavljanje njihove pravilne strukture i funkcije. Glikani (oligosaharidi i polisaharidi) su strukturno heterogena skupina molekula iji primarni slijed nije predodre en kalupom, ve ovisi o koli ini i aktivnosti procesiraju ih enzima – glikoziltransferza i glikozidaza. I najmanja promjena u strukturi glikanske komponente se može negativno odraziti na stabilnost, topljivost i funkciju proteina, što esto uzrokuje mnoge bolesti (Kusali , 2010).

Proteini svih živih bi a se naj eš e *N*-glikoziliraju, što uklju uje vezanje ugljikohidrata na amidni dušikov atom asparagina slijeda Asn-X-Ser/Thr. Za uspješnu *N*-glikozilaciju, osim enzima, potreban je lipidni nosa koji e vezati glikanski prekursor, translocirati ga na drugu stranu membrane i kona no biti izlazna skupina prilikom prijenosa glikana na protein. Reakcije *O*-glikozilacije najviše su zastupljene kod eukariota prilikom sinteze proteoglikana, važnih za o uvanje elasti nosti i strukture izvanstani nog matriksa (Schwarz i Aebi, 2011; Kusali , 2010).

Terapeutski proteini su široka skupina glikoproteina koji služe lije enju razli itih patoloških stanja. Glikozilacija igra veoma važnu ulogu u modeliranju terapeutskih svojstva takvih proteina te utje e na njihovu apsorpciju, biodostupnost i distribuciju do ciljnih stanica te cirkulacijsko vrijeme u organizmu i zaštitu od proteaza (Bladon, 2002; Solá i Greibenow, 2010).

Prvi proizvedeni terapeutski protein je bio humani rekombinatni eritropoetin, a poslužio je, izme u ostalog, lije enju anemije nastale kroni nim zatajenjem bubrega. Za proizvodnju terapeutskih proteina se uglavnom koriste tri stani ne linije: *E. coli*, kvasci i stanice jajnika kineskog hr ka. Sva tri ekspresijska sustava imaju svoje prednosti i nedostatke, pošto je teško reproducirati isti glikozilacijski obrazac kakav nastaje u stanicama ovjeka. Raznim manipulacijama (poput *knockouta* neželjenog glikozilacijskog gena) se dobivaju stani ne linije koje su glikozilacijski prihvatljivije i koje omogu uju nesmetanu proizvodnju terapeutskih proteina (Garnier i Reichard, 2005).

Glikoinženjering obuhva a metode kojima je mogu e manipulirati glikozilacijom terapeutskih proteina u svrhu postizanja ve e terapijske efikasnosti. Dodatak ili eliminacija ugljikohidrata može pozitivno utjecati na farmakokineti ka i

farmakodinami ka svojstva terapeutskih proteina. Pokazano je da prisutstvo negativno nabijenih glikana (poput sijalm preinakama, geni ozna eni simbolom \* su



o svih glikozilacijskih gena. Geni označeni simbolom \*\* su pojava i eksprimirani)

(preuzeto iz Xu, Nagarajan i suradnici, 2009)

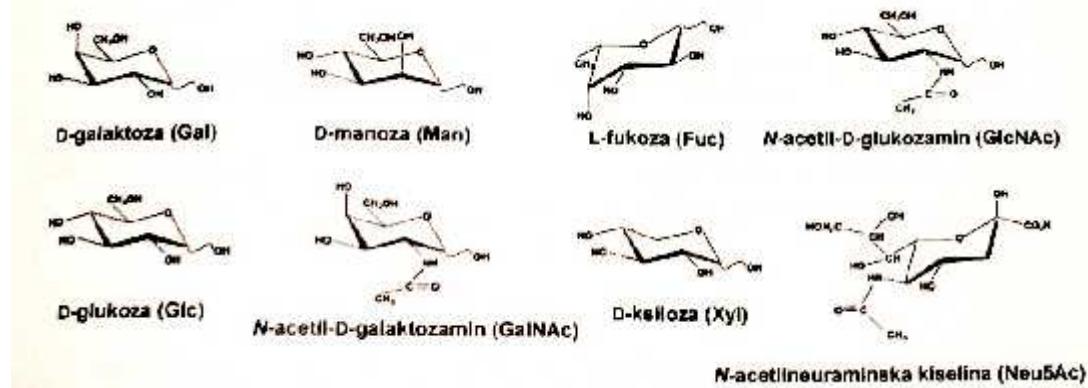
### 3.2. Eritropoetin – prvi terapeutski protein

Humani eritropoetin (EPO) je esencijalni glikoproteinski hormon koji se u odrasloj dobi sintetizira u bubrežima i izlučuje u krv. Krvotokom odlazi u koštanu srž gdje vezanjem na EPO receptor stimulira eritropoezu. Eritropoeza uključuje procese diferencijacije i proliferacije stanica eritroidne loze iz pluripotentne hematopoetske

liferacije stanica eritroidne loze iz pluripotentne hematopoetske mati ne stanice. Smanjena koncentracija kisika, kao i smanjen broj eritrocita u krvi (uslijed npr. boravka na visokim nadmorskim visinama) glavni su stimulansi za izlučivanje eritropoetina (Sl.8). Patološko stanje smanjenog broja eritrocita u krvi ili nedovoljno sintetiziranog hemoglobina u eritrocitima zove se anemija. Anemija koja nastaje zbog deficit željeza, lako se lije i nadoknadom željeza putem **hrane i tableta**. Međutim, oterapija i kronično zatajenje bubrega uništavaju stanice bubrega koje proizvode eritropoetin što ireverzibilno sprječava stvaranje novih eritrocita (Kusalić, 2010) čemu dolazi do vezanja ugljikohidrata na protein pomoći u N- ili O- glikozidne veze ili e C-C veze. Glikozilacija je složen, ali nužan proces jer uvelike utječe na stabilnost proteina, njihovo smatanje i uspostavu pravilne konformacije, topljivost, biomolekularno prepoznavanje i prijenos signala, te zaštitu od proteaza i uklanjanje iz krvotoka (Kusalić, 2010).

Glikani (oligosaharidi ili polisaharidi) su strukturno veoma raznolike molekule čije svojstva variraju ovisno o identitetu i broju monosaharida koji ih izgrađuju, načinu povezivanja (ravnili ili razgranati lanci), te kemiji veze ( $\alpha$  ili  $\beta$  konfiguracija glikozidne veze) (Kusalić, 2010). Za razliku od proteina, koji je aminokiselinski slijed predodređen DNA kalupom, konačna struktura glikana ovisi o kolичini eksprimiranih procesivnih enzima – glikoziltransferaza (sintetiziraju glikan) i glikozidaza (hidroliziraju glikozidnu vezu, cijepaju glikan) te njihovoj specifičnosti prema supstratu (Garnier i Reichard, 2005).

Uobi ajeni monosaharidi koje nalazimo u *N*-glikoproteinima uklju uju: D-glukozu, D-galaktozu, L-fukozu, *N*-acetilneuroaminsku (sijalinsku) kiselinu, dok u *O*-glikoproteinima još nalazimo i *N*-acetil-D-glukozamin, *N*-acetil-D-galaktozamin i D-manozu (Sl.1). Promjene u glikanskim komponentama mogu zna ajno utjecati na biološku funkciju proteina na kojeg su vezani, stoga nepravilna ili nepotpuna glikozilacija može uzrokovati ozbiljne patološke i maligne promjene (Kusali , 2010).



**Slika 1.** Monosaharidi koji sudjeluju u izgradnji glikoproteina

(preuzeto iz Kusali , 2010)

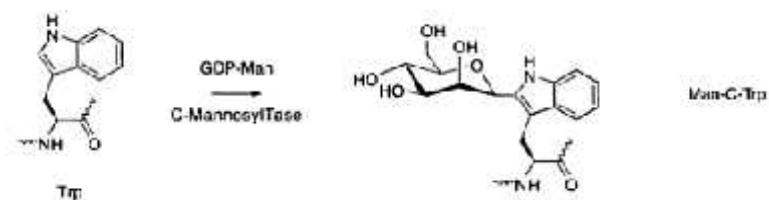
U osnovi razlikujemo dvije vrste glikoziliranih proteina ovisno o veli ini ugljikohidratne komponente: proteoglikane, koji su važni za uspostavljanje i o uvanje integriteta izvanstani nog matriksa, te glikoproteine, koji imaju niz bioloških funkcija: na ekstracelularnoj strani membrane sudjeluju u prijenosu signala i prepoznavanju stanice, unutar stanice sudjeluju u vezikularnom transportu, a u krvi sudjeluju kao protutijela u imunološkoj reakciji (Nelson i Cox, 2008). Postoje i tre a vrsta glikoziliranih proteina, tzv. mucini, koji sadrže velik broj *N*-acetilglukozamina povezanih na serinske ili treoninske bo ne ogranke. Funkcija im je lubrikacija, stoga su neizostavni u mukoznom sekretu dišnog, probavnog i urogenitalnog sustava (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012).

Ugljikohidrati se povezuju na proteine složenim enzimskim reakcijama koje se u eukariotskoj stanici odvijaju u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu. Postoje više razli itih na ina povezivanja ugljikohidrata i proteina:

1. *N*-glikozilacija, uklju uje povezivanje ugljikohidrata na amidni dušikov atom asparagina u slijedu Asn-X-Ser/Thr gdje je X bilo koja aminokiselina izuzev proline (Kusali , 2010), stoga aminokiselinski slijed proteina može otkriti potencijalna mjesta *N*-glikozilacije. Ovisno o tipu stanice, isti protein ne mora biti

jednako i na svim potencijalnim mjestima glikoziliran (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012).

2. *O*-glikozilacija, uklju uje povezivanje ugljikohidrata na bo ni ogrank serina ili treonina, te 4-hidroksilizina i 4-hidroksiprolina (Kusali , 2010).
3. *C*-glikozilacija (*C*-manozilacija), ugljikohidrat (manoza) se povezuje na ugljikov atom bo nog ogranka triptofana (S1.2). Rezultat povezivanja nije tipi na glikozidna veza, ve *C-C* veza. Istraživanja su pokazala da je supstrat *C*-glikozilacije prvi triptofan u slijedu Trp-X-X-Trp, a makar više od 300 proteina kod sisavaca sadrži slijed Trp-X-X-Trp, to na funkcija ove specifi ne modifikacije nije još poznata (Varki, Cummings, Esko i suradnici, 1999; Kusali , 2010).
4. Ugljikohidrati su komponente glikofosfatidilinozitolnog sidra ime posreduju u vezanju nekih proteina na membranu (protein je vezan na ugljikohidrate preko fosfoetanolamina, a ugljikohidrati su vezani na membranu preko fosfatidilinozitola) (Kusali , 2010).

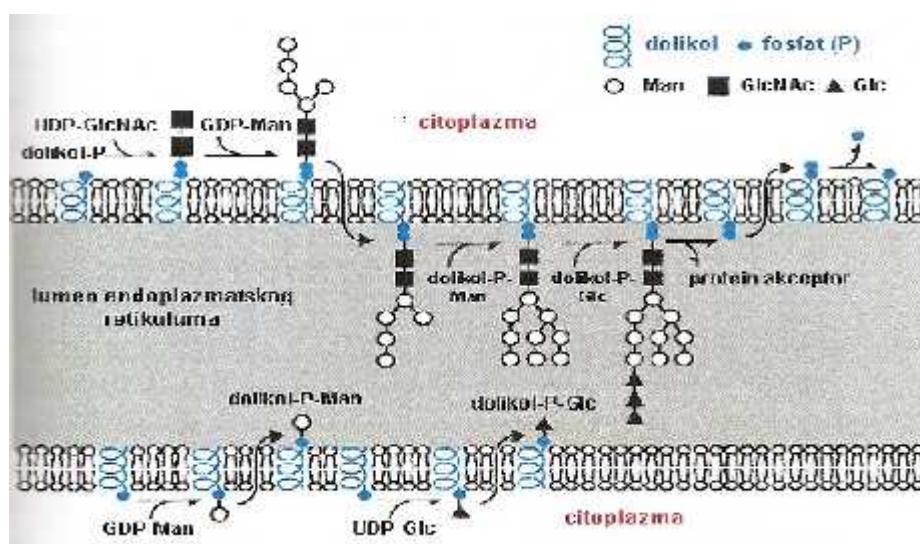


**Slika 2.** Reakcija *C*-glikozilacije manoze na bo ni ogrank triptofana katalizirana *C*-manoziltransferazom  
(preuzeto iz Walsh, 2006)

Monosaharidi poput glukoze, fruktoze i galaktoze mogu se vezati na proteine neenzimskim procesom koji se naziva glikacija. Glikacija se odvija u krvotoku u prisustvu visoke koncentracije navedenih monosaharida. Za razliku od glikozilacije koja se pod kontrolom enzima odvija na to no definiranim mjestima proteina i nužna je za njihovo pravilno smatanje, stabilnost i funkciju, glikacija je štetan proces koji remeti funkciju proteina i poti e stvaranje popre nih kovalentnih veza. Dugoro no, glikacija uzrokuje nakupljanje razli itih polimeriziranih produkata koji su odgovorni za brojne kardiovaskularne, autoimune i neurodegenerativne bolesti (<http://www.legendarypharma.com/glycation.html> ).

## 2.1. N-glikozilacija

Naj eš i na in glikozilacije proteina je stvaranje *N*-glikozidne veze s asparaginom signalnog slijeda Asn-X-Ser/Thr. Nedavna istraživanja su pokazala da je *N*-glikozilacija prisutna i kod arheja i bakterija gdje je takođe od fundamentalne važnosti za funkciju proteina. Oligosaharidni supstrat nužan za glikozilaciju sintetizira se u nizu enzimskih reakcija na plazmatskoj membrani prokariota i citosolnoj strani ER-a eukariota. Mnoštvo glikoziltransferaza katalizira prijenos monosaharidnih jedinica na lipidni nosa membrane (monosaharidi su prije transporta nukleotidno aktivirani). Nastali oligosaharid usidren na lipidni nosa (u dalnjem tekstu LLO, od eng. *lipid-linked oligosaccharide*) translocira se u periplazmatski prostor kod prokariota, odnosno u lumen ER-a kod eukariota gdje sudjeluje kao donor u procesu glikozilacije. Oligosahariltransferaza (OST) pretražuje signalni slijed Asn-X-Ser/Thr na akceptorskom proteinu te katalizira prijenos oligosaharda na bojni ogranaček asparagina (Sl.3) (Schwarz i Aebi, 2011).



**Slika 3.** Prikaz biosinteze LLO-a, prijenos glikana na akceptorski protein i konačna regeneracija fosforiliranog lipidnog nosa a  
(preuzeto iz Kusali , 2010)

Lipidni nosa je evolucijski konzerviran, a po kemijskoj strukturi je fosforilirani poliizoprenoid - dolikol ili undekaprenol. Svojim specifičnim strukturnim svojstvima sudjeluje u translokaciji, utječe na efikasnost procesa glikozilacije ovisno o dostupnosti za vezanje supstrata, te je dobra izlazna skupina za OST reakciju, nakon

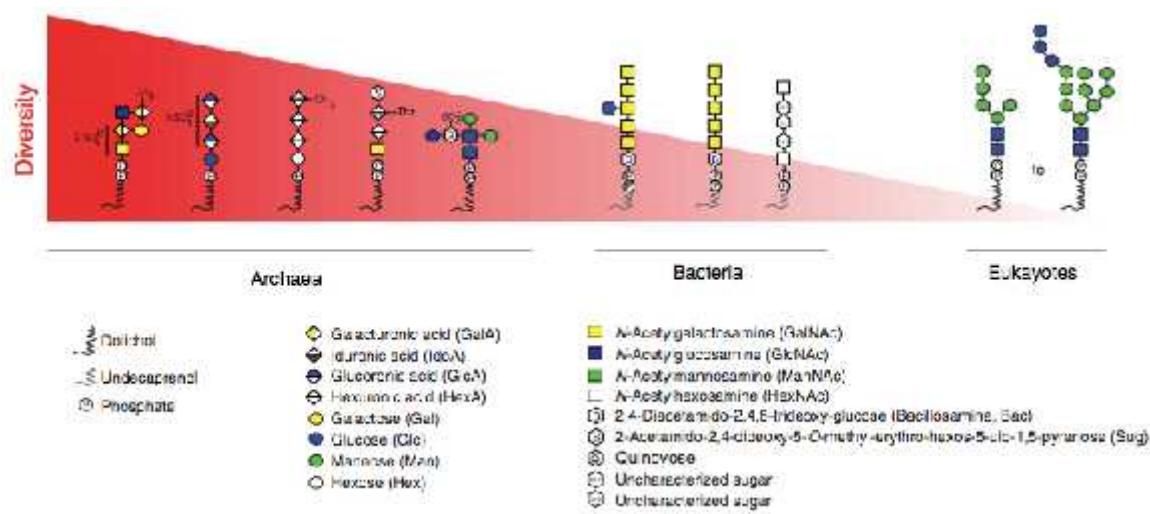
koje ostaje vezan na membranu spreman za idu i kataliti ki ciklus (Schwarz i Aebi, 2011).

Za razliku od konzerviranog lipidnog nosa a, oligosaharidna komponenta LLO-a uvelike varira izme u prokariota i eukariota (Schwarz i Aebi, 2011) (Sl.4). Glikozilirani proteini arheja i bakterija su uglavnom površinski proteini, flagelini te enzimi koji razgra uju polisaharide (Kusali , 2010).

Arheje, kao što je *Halobacterium salinarum*, pokazuju najve u heterogenost u gra i LLO-a. Arheje obi no sadrže više od jedne vrste LLO-a po stanici pošto se arhealni glikani mogu modificirati metilacijom, sulfonacijom ili adicijom aminokiselina, te se sintetiziraju na dolikol-fosfatu ili dolikol-pirofosfatu.

Mali broj bakterija uop e može katalizirati procese *N*-glikozilacije, uglavnom se radi o Gramm negativnim bakterijama. Takve bakterije pokazuju manju heterogenost u gra i LLO-a u odnosu na arheje (Schwarz i Aebi, 2011).

Prekursori eukariotskih *N*-glikana slijede odre eni strukturni obrazac, sastoje se od 3 molekule glukoze, 9 molekula manoza i 2 molekule *N*-acetilglukozamina (Kusali , 2010). Nakon sinteze, slijedi translokacija u lumen ER-a pomo u flipaze, gdje eukarioti mogu dodatno produljiti glikansku komponentu LLO-a. Glikan se prenosi na ciljni protein koji se dalje procesira u ER-u i Golgijevom aparatu (Schwarz i Aebi, 2011). Procesiranje podrazumijeva niz enzimskih procesa koji rezultiraju odcjepljivanjem manoze pomo u manozidaze, dodatkom razli itih vrsta monosaharida na glikansku okosnicu te razgranjenjem itavog glikana. (Kusali , 2010).



Slika 4. Ravnolikost u strukturi LLO-a izme u domena.

(arheje i bakterije sintetiziraju više različitih i strukturno heterogenih vrsta LLO-a, dok eukarioti sintetiziraju LLO-e odrene konzervirane strukture)  
(preuzeto iz Schwarz i Aebi, 2011)

## 2.2. O-glikozilacija

Stvaranje *O*-glikozidne veze se u eukariota odvija u Golgijevom aparatu nakon smatanja i oligomerizacije proteina. *O*-glikani uglavnom započinju *N*-acetilgalaktozaminom, manozom ili fukozom, nakon čega slijedi postupno dodavanje ostalih monosaharida pomoću glikoziltransferaza. Signalni slijed ne postoji, ali uobičajeno su glikozilirani serini i treonini u slijedu bogatom prolinima (Kusali , 2010). Negativno nabijeni glikozaminoglikani se procesom *O*-glikozilacije povezuju na tzv. proteine srži, čime nastaju proteoglikani. Proteoglikani ostvaruju interakcije s kolagenom izvanstani nog matriksa, ali i raznim faktorima rasta, stoga su važni za proces rasta i diferencijacije stanica (Nelson i Cox, 2008).

Postoje, međutim, slučajevi *O*-glikozilacije 4-hidroksiprolina i 4-hidroksilizina. Hidroksilacija i glikozilacija lizina u kolagenu sprječava međusobno povezivanje molekula kolagena poprimerenim kovalentnim vezama što je važno za održavanje elastičnosti i integriteta izvanstani nog matriksa. *O*-glikozilacija postoji i kod arheja i nekih patogenih bakterijama kao što su *Helicobacter pylori*, *N. Gonorrhoeae* i *Pseudomonas aeruginosa* (Kusali , 2010).

### **3. TERAPEUTSKI PROTEINI**

Terapeutski proteini su najčešći rekombinantni humani proteini koje *in vitro* mogu sintetizirati različite stanične linije. Obuhvaćaju veliku skupinu proteina koji služe lječenju različitih metaboličkih i biokemijskih abnormalnosti nastalih kao posljedica bolesti (poput dijabetesa i anemija), nasljednih poremećaja (poput hemofilije i Gaucherove bolesti) i tumora. Terapeutski proteini ublažavaju simptome ili potpuno liječe, makar nisu usmjereni na neutralizaciju uzroka patološkog stanja. Terapeutski proteini su uglavnom glikoproteini (hormoni, enzimi, faktori rasta, neka monoklonalna protutijela i dr.) stoga je proces glikozilacije važan prilikom njihove proizvodnje jer znaju utjeći na stabilnost i terapijsku učinkovitost proteina (Bladon, 2002; Baumaister, 2004).

Postoje tri temeljne primjene terapeutskih proteina u liječenju:

1. Direktna zamjena proteina/enzima (*eng. enzyme replacement therapy*). Takva terapija služi lječenju bolesti u kojima nedostaje određeni protein ili enzim (kao što je kod dijabetesa i hemofilije). Terapija zahtjeva konstantno uzimanje deficitarnog proteina nakon njegove degradacije u krvotoku ili izlučivanja. Glikoinženeringom se

može manipulirati glikozilacijom terapeutskih proteina i tako znatno povećati vrijeme zadržavanja proteina u krvi (više u poglavljiju *Glikoinženjering*).

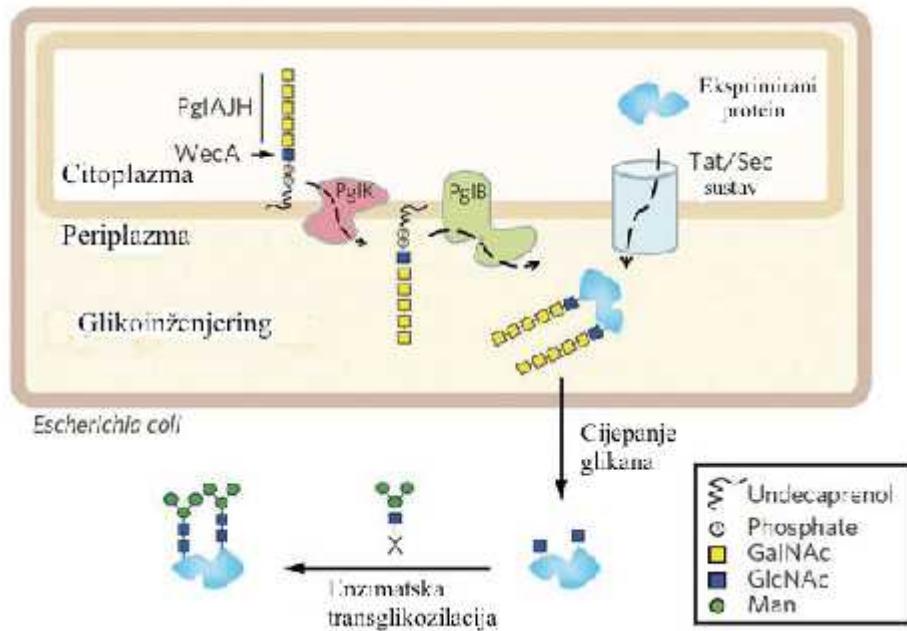
2. Simptomatsko liječenje uključuje veoma selektivnu i kratkotrajnu intervenciju terapeutskog proteina u suzbijanju nekog patološkog procesa. Formiranje krvnog ugruška u arterijama koje snabdjevaju srčani mišić hranjivim tvarima može dovesti do infarkta, stoga postoje terapeutski proteini (rekombinantni plazminogenski aktivatori) koji enzimski razgrađuju ugrušak.

3. Profilaktičko liječenje omogućava imunološku zaštitu protiv različitih patogena. Poznavanjem molekularne strukture uzrovnika, moguće je dio površine (epitop) izolirati ili sintetizirati u laboratoriju, te iskoristiti za stimuliranje imunološkog sustava prije kontakta s patogenom (cijepljenje). Zahvaljujući cijepljenju moguće je prevencija raznih bolesti kao što su polimijelitis, ospice, rubeola i tetanus (Bladon, 2002; Baumaister, 2004).

### **3.1 Ekspresijski sustavi i proizvodnja terapeutskih proteina**

Općenito postoje dvije vrste ekspresijskih susava: prokariotski i eukariotski. Za sintezu terapeutskih proteina najčešće se koriste tri tipa stanovnih linija: *Escherichia coli* (prokariotski ekspresijski sustav), kvasci i stanice jajnika kineskog hraka (eukariotski ekspresijski sustavi). Međutim, danas se sinteza terapeutskih proteina provodi i u humanim stacionarnim linijama. Odabir prikladne stacionne linije najviše ovisi o istraživaču i zadanim ciljevima (Garnier i Reichard, 2005).

Prokariotski sustav (*E. coli*) jednostavan je za manipulaciju, industrijski jeftin i proizvodi velike količine rekombinantnih proteina (Sl.5). Međutim, *E. coli* na drugačiji način glikozilira svoje proteine od eukariota. Nema potrebne glikoziltransferaze i glikozidaze, stoga humani terapeutski proteini eksprimirani u *E. coli* imaju promijenjen glikozilacijski obrazac i svojstva. *E. coli* se svejedno koristi za sintezu prve generacije terapeutskih proteina prije prebacivanja proizvodnje u prikladan eukariotski sustav (Garnier i Reichard, 2005; Kusalić, 2010).

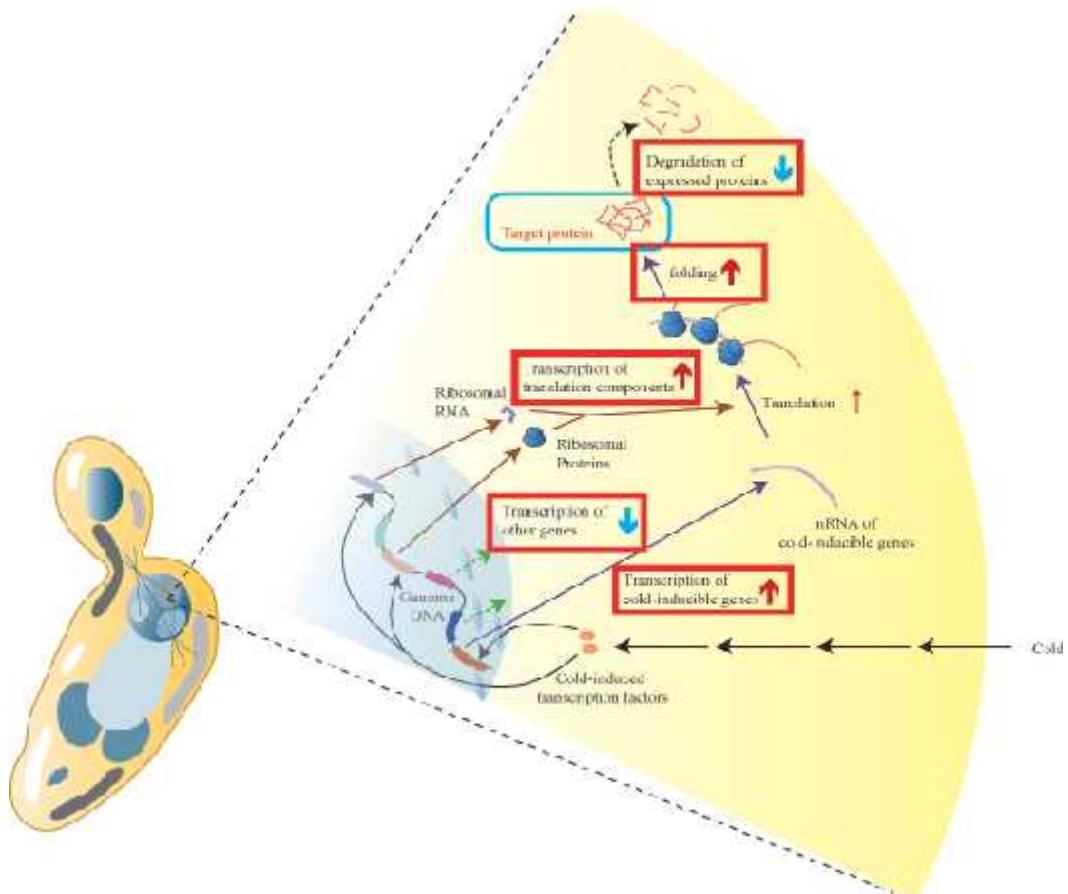


**Slika 5.** Shematski prikaz ekspresijskog sustava kod *E.coli*

(u prikazanom sustavu, proteini se nakon sinteze i glikozilacije translociraju u periplazmatski prostor. Tamo enzimi cijepaju glikane na manje fragmente, nakon ega ih tranzglikozilaze remodeliraju da izgledaju poput eukariotskih *N*-glikana)

(prilagođeno prema Schwarz, Huang, Li i suradnici, 2010)

Kvaci (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) i neke filamentozne gljivice su, takođe, veoma prikladni sustavi za proizvodnju velike količine terapeutskih proteina (Sl.6). Stanice se relativno brzo dijele i stvaraju guste nakupine koje se uザgajaju u mediju koji ne sadrži komponente animalnog porijekla koje bi mogле interferiati u proizvodnji humanih glikoproteina. *N*-glikani koje sintetiziraju spomenuti organizmi su bogati manozom. Manoza je esto prisutna na površini bakterijskih stanica i virusnih estica te je u visokim koncentracijama snažno imunogeni na - sposobna je potaknuti sudionike specifičnog imunološkog odgovora na senzibilizaciju i sintezu protutijela, koja bi potom neutralizirala terapeutski protein. Radi izbjegavanja takvog ishoda, provodi se tzv. humanizacija glikozilacijskog puta, deletiranjem gena koji kodira endogene kvaševe glikoziltransferaze. Ostale se glikoziltransferaze, koje stvaraju glikanske strukture prikladnije za unos u ljudski organizam, lokaliziraju i ostavljaju intaktne (Garnier i Reichard, 2005; Kusalić, 2010).

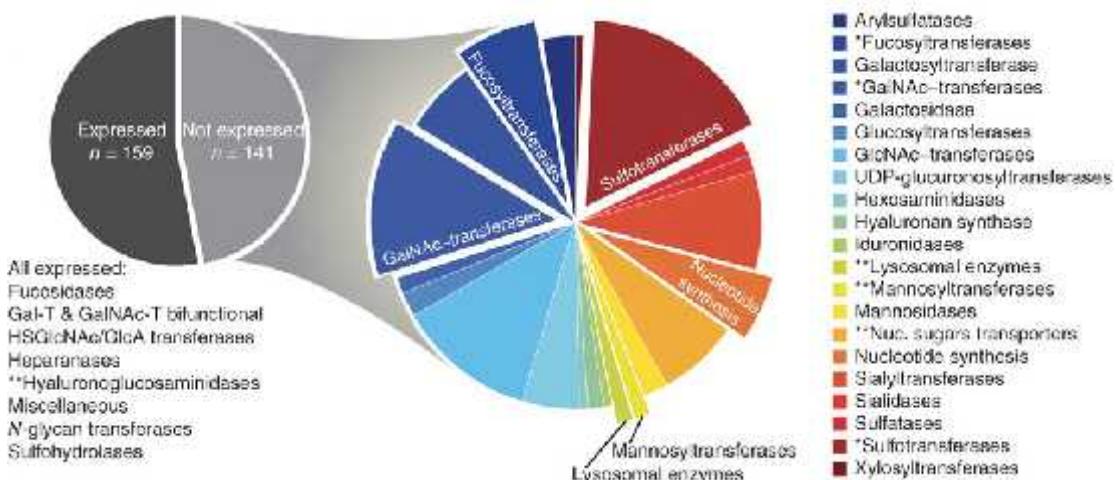


**Slika 6.** Ekspresijski sustav kvasca *Saccaromyces cerevisiae*

(prikanzani ekspresijski sustav je modificiran tako da se sintetiziran protein pravilno smata jedino pri niskim temperaturama)

(preuzeto s [http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research\\_e.html](http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research_e.html))

Za proizvodnju humanih terapeutskih proteina naj eš e se odabiru stanice jajnika kineskog hr ka (eng. *chinese hamster ovary*, CHO), radi postizanja što prikladnije glikozilacije. Sisavci posjeduju jako kompleksni glikozilacijski sustav kojeg, ovisno o tipu stanice, ini više od 200 procesiraju ih enzima. Za razliku od humanih stanica, CHO stanice stvaraju nizak postotak sijaliziranih proteina, proteini koji su sijalizirani sadrže sijalinsku kiselinu Neu5Gc umjesto humane Neu5Ac (što potencijalno može izazvati imunološku reakciju), te glikani esto sadrže disaharid Gal( 1-3)Gal koji ne postoji kod ljudi. Primjenom geneti kog inženjerstva mogu e je uvesti gen za sijaliltransferazu i tako pove ati udio sijalinske kiseline u humanim terapeutskim proteinima koje eksprimiraju CHO stanice (Sl.7) (Garnier i Reichard, 2005).



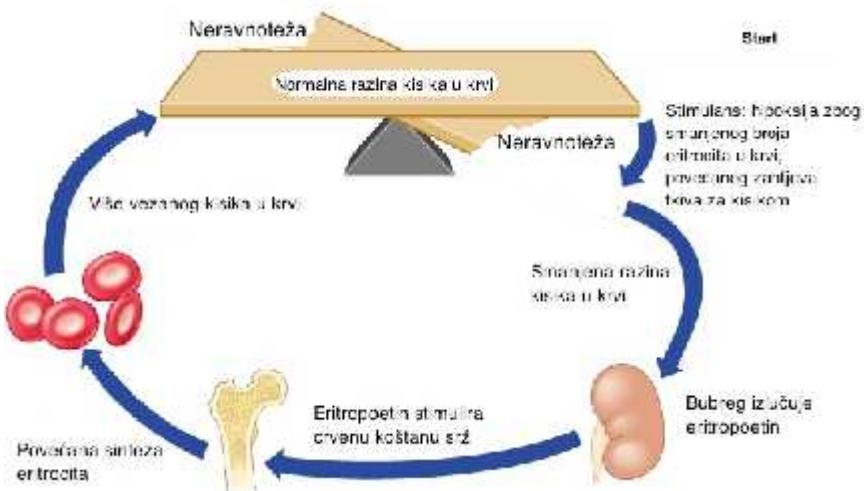
**Slika 7.** Prikaz glikozilacijskih gena koje eksprimira stani na linija CHO-K1, izvedena iz originalne CHO linije

(53% svih glikozilacijskih gena je eksprimirano. Zahvaljujući genetikim preinakama, geni označeni simbolom \* su znatno manje eksprimirani, makar i u dio svih glikozilacijskih gena. Geni označeni simbolom \*\* su pojavljano eksprimirani)

(preuzeto iz Xu, Nagarajan i suradnici, 2009)

### 3.2. Eritropoetin – prvi terapeutski protein

Humani eritropoetin (EPO) je esencijalni glikoproteinski hormon koji se u odraslo doba sintetizira u bubrežima i izlučuje u krv. Krvotokom odlazi u koštanu srž gdje vezanjem na EPO receptor stimulira eritropoezu. Eritropoeza uključuje procese diferencijacije i proliferacije stanica eritroidne loze iz pluripotentne hematopoetske mati ne stanice. Smanjena koncentracija kisika, kao i smanjen broj eritrocita u krvi (uslijed npr. boravka na visokim nadmorskim visinama) glavni su stimulansi za izlučivanje eritropoetina (Sl.8). Patološko stanje smanjenog broja eritrocita u krvi ili nedovoljno sintetiziranog hemoglobina u eritrocitima zove se anemija. Anemija koja nastaje zbog deficit-a željeza, lako se lijevi i nadoknadom željeza putem hrane i tableta. Međutim, razne infekcije, kemoterapija i kronično zatajenje bubrega uništavaju stanice bubrega koje proizvode eritropoetin što ireverzibilno sprječava stvaranje novih eritrocita (Kusalić, 2010) (<http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/>).



**Slika 8.** Shematski prikaz odgovora na sniženu koncentraciju kisika u krvi

(izlučivanje eritropoetina je pod negativnom povratnom spregom)

(prilagođeno prema <http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/>)

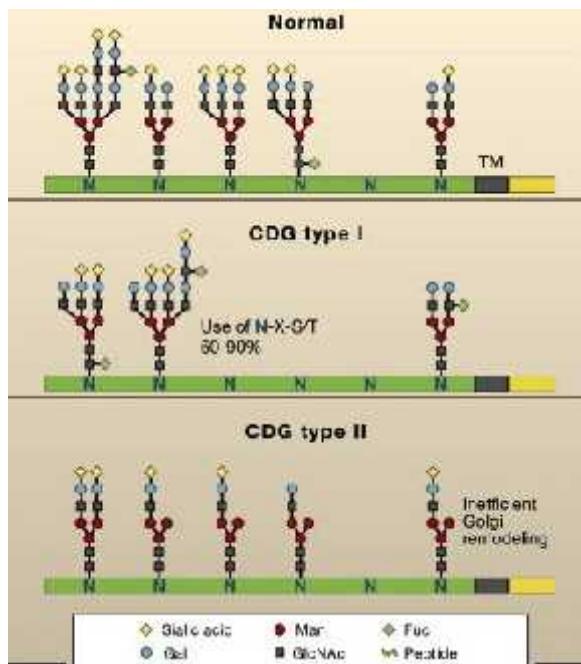
EPO je izrazito glikoziliran protein koji uobičajen vijek poluživota u krvi iznosi oko 5 sati. Istraživanja su pokazala da je neglikozilirani EPO jako nestabilan i formira agregate što rezultira potpunim gubitkom funkcije. Također je pokazano da nepravilna glikozilacija proteina EPO (npr. nedostatak sijalinske kiseline) dovodi do prijevremene degradacije hormona u krvi. Dakle, na biološku aktivnost EPO utječe stupanj glikozilacije (konkretno sijalizacije) što je bila značajna injenica prilikom proizvodnje humanog rekombinantnog eritropoetina (*rhEPO*) u CHO stanicama. *rhEPO* je prvi terapeutski protein, pojavio se na tržištu 1980-ih godina i znatno je pospješio liječenje anemija uzrokovanih uništavanjem stanica bubrega. *rhEPO* nije pokazivao imunogeničnost pri unosu u organizam, makar se od prirodnog hormona razlikovao u strukturi vezanih glikana (posljedica sinteze u CHO stanicama). Do danas je sintetski proizvedeno nekoliko vrsta *rhEPO*, a od 2001. se za liječenje anemija koristi hiperglikozilirani analog *rhEPO-a* nazvan NESP (eng. *novel erythropoiesis stimulating protein*) ili darbepoetin alfa. NESP sadrži pet *N*-glikozilacijskih mesta (tri prirodna i dva uvedena). Zahvaljujući dodatnim glikozilacijskim signalnim slijedovima, povećan je sadržaj sijalinske kiseline što dovodi do duže cirkulacije i zadržavanja hormona u organizmu, ali i manjeg afiniteta za vezanje na EPO receptor u odnosu na *rhEPO*. Međutim, dulji poluživot u krvi nadmašuje smanjeni afinitet vezanja na receptor, stoga NESP djeluje efikasnije od

*rhEPO* i zahtjeva manje u estali unos u organizam uz isti terapeutski u inak. (Kusali , 2010.; Garnier i Reichard, 2005).

#### **4. GLIKOINŽENJERING**

Pojedini glikoprotein može postojati u više glikoformi, ako je aminokiselinski slijed o uvan, a varira broj i vrsta monosaharidnih jedinica vezanih glikana te okupiranost glikozilacijskih mjesta. Postojanje različitih glikoformi istog glikoproteina ovisi o količini eksprimiranih procesirajućih enzima (glikoziltransferaza i glikozidaza), njihovoj specifičnosti prema supstratu, vremenskom trajanju

procesiranja istim enzimom i lokalizaciji enzima u stanici (Sl.9) (Kusali , 2010; Garnier i Reichard, 2005).



**Slika 9.** Prikaz tri različite glikoforme istog proteina

(u ovom slučaju je postojanje različitih glikoformi posljedica tzv. glikozilacijske kongenitalne bolesti i može dovesti do snažne autoimmune reakcije i smrti. U prvom tipu bolesti, osim što je promjenjena struktura N-vezanih glikana, preostala uobičajena glikozilacijska mjesto su ostala prazna. Dok su u drugom tipu bolesti prisutni svi glikani, ali su također potpuno izmjenjeni zbog nedostatnog procesiranja u Golgijevom aparatu)

(preuzeto iz Dennis, Nabi i Demetriou, 2009.)

Promjena glikozacijskog obrasca na površini proteina omogućava manipulaciju fizikalno-kemijskim i farmakodinamickim svojstvima terapeutskih proteina s ciljem stimuliranja njihove terapijske efikasnosti. Glikoinženjeringom možemo ciljano uvoditi glikanske strukture (pomoći specifičnih glikoziltransferaza) koje će dodatno stabilizirati proteine i sprječiti farmakološki neželjene promjene poput oksidacije, popremanog povezivanja, denaturacije, precipitacije, kinetičke inaktivacije ili agregacije. Također, dodatna glikozilacija može usporiti proteolitučku degradaciju proteina *in vivo* što produžuje vrijeme njihovog biološkog djelovanja. Uz već spomenuti NESP, neki od terapeutskih proteina tijek je proteoliza znatno odgođena glikozilacijom uključujući i interferon- $\gamma$ , protutijela slična IgG-u, urokinazu alfa i tireotropin alfa, a nedavna istraživanja su pokazala da proteolizu najefikasnije

odga aju negativno nabijeni glikani poput sijalinske kiseline (Solá i Greibenow, 2010).

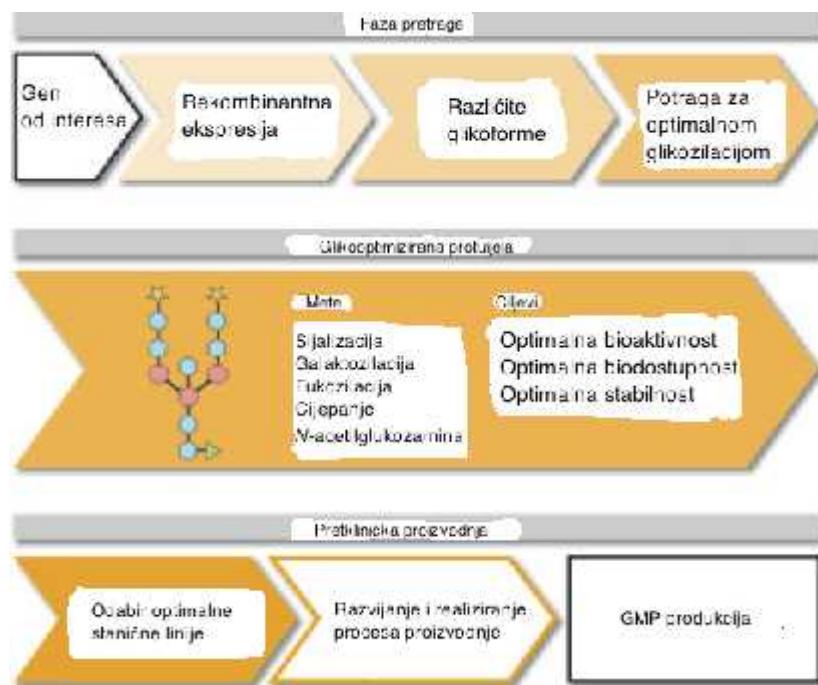
#### **4.1. Glikooptimizacija**

Glikozilacijom terapeutskih proteina moduliraju se i njihova farmakokineti ka svojstva što utje e na njihovu apsorpciju, distribuciju i cirkulaciju u organizmu te izlu ivanje. Optimalna glikozilacija stoga podrazumijeva bolju apsorpciju terapeutskog proteina, duže cirkulacijsko vrijeme i distribuciju do svih organa, tkiva i stanica u organizmu gdje potencijalno može djelovati te pravovremenu degradaciju i uklanjanje iz organizma, zbog mogu eg toksi nog djelovanja ili izazivanja imunološkog odgovora (Solá i Greibenow, 2010; Baumaister i Goletz, 2010).

Glikooptimizacija terapeutskih proteina postiže se na idu e na ine (Sl.10):

1. Glikozilacija se enzimski modificira nakon proizvodnje terapeutskih proteina (tzv. metoda remodeliranja glikoproteina). Metoda se temelji na *in vitro* manipulaciji glikozilacije dodatkom glikoziltransferaza i/ili glikozidaza (ovisno o efektu koji želimo posti i) u stani nu kulturu koja proizvodi terapeutске proteine. Me utim, mora se imati na umu da razli ita regioselektivnost, specifi nost prema supstratu i interakcija enzima sa supstratom može utjecati na ishod glikozilacije, pa se ne e dobiti potpuno homogena populacija proteina (Baumaister i Goletz, 2012; Garnier i Reichard, 2005).
2. Odabire se što prikladnija stani na linija za proizvodnju glikoproteina i strogo se kontroliraju uvjeti prozivodnje. Raznim manipulacijama (poput ve navedene s CHO stanicama) može se dobiti stani na linija s glikozilacijskim mehanizmom prilago enim proteinu od interesa. Npr. biljne stanice u svoje *N*-glikane ugra uju velike koli ine monosaharida ksiloze. U ljudskim *N*-glikanima ksiloza nije prisutna, stoga ako se želi posti i da biljna stani na linija proizvede terapeutске proteine kojim e se lije iti ovjeka, mora se napraviti *knockout* gena koji kodira glikoziltransferazu specifi nu za ksilozu. Za proizvodnju ljudskih proteina u novije vrijeme se umjesto CHO stanica koriste i ljudske stani ne linije razli itih profila glikozilacije (sa/bez 1,6-fukozilacije, sa/bez 2,6-sijalinizacije, puno/malo galaktozilacije i sl.) što omogu ava odabir najprikladnije glikoforme proteina.

3. Genetičkim inženjerstvom se mogu dodati ili eliminirati glikozilacijska mesta (signalni slijedovi) na proteinu (Baumaister i Goletz, 2010).

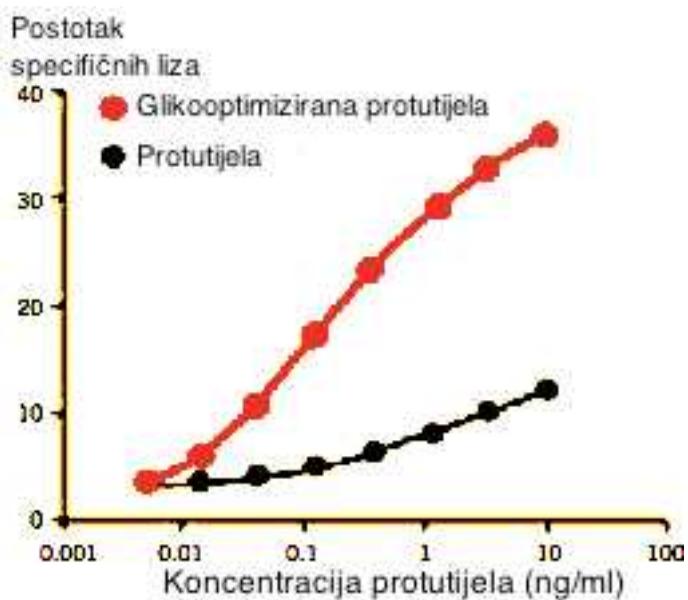


**Slika 10.** Prikaz glikooptimizacije kroz nekoliko etapa

(posljednji korak se odnosi na sintezu proteina za pretklinička testiranja, zbog provjeravanja kvalitete i sigurnosti nastalih proteina)

(prilagođeno prema Baumaister i Goletz, 2010)

U posljednje vrijeme se farmaceutski laboratoriji intenzivno bave glikooptimizacijom terapeutskih protutijela (Baumaister i Goletz, 2010). Protutijela (imunoglobulini) su glikoproteini građeni od dva temeljna funkcionalna fragmenta: Fab koji stvara vezno mjesto te specifično veže epitop antigena i Fc koji sudjeluju u prijenosu signala u stanici (efektorska uloga) (Andreis, 2010). IgG sadrži dva *N*-glikozilacijska mesta na Fc fragmentu, a 30% IgG-a izoliranih iz ljudskog seruma, sadrži i jedno dodatno *N*-glikozilacijsko mjesto na Fab fragmentu. Proizvodnja tih protutijela u modificiranim humanim stanicama koje ne provode 1,6-fukozilaciju, znatno stimulira efikasnost protutijela *in vivo* i *in vitro* te takva protutijela snažnije aktiviraju antitumorske stanice NK (*natural killer*) kao i citotoksične T-limfocite (Sl.11) (Baumaister i Goletz, 2010).

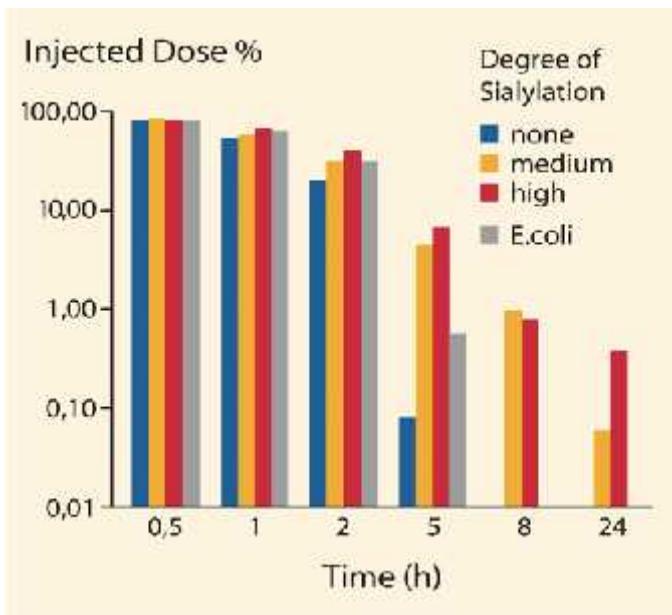


**Slika 11.** Značajna promjena efikasnosti citotoksičnosti zbog manipuliranja glikozilacijom protutijela

(Rezultati pokazuju da, pri jednakoj koncentraciji, glikozilirana protutijela efikasnije aktiviraju citotoksične stanice)

(prilagođeno prema Baumaster i Goletz, 2010)

Osim do sad navedenih, postoji još mnogo primjera terapeutskih proteina i ja je efikasnost znatno poboljšana glikoinženeringom. Dvije farmaceutske tvrtke su dugi niz godina jedan (neimenovani) faktor rasta proizvodile u *E.coli* i stanicama kvasca. U tim stanicama linijama ili uopće nije dolazilo do glikozilacije ili jest, ali je sadržaj sijalinske kiseline bio jako nizak. Nakon određenog vremena, proizvodnja faktora rasta je prebačena u treće stanicu liniju koja je glikozilirala proteine sve im stupnjem sijalizacije. Nakon testiranja na miševima, potvrđen je znatni porast aktivnosti faktora rasta što je naponslijetku dovedeno u vezu sa stupnjem sijalizacije (Sl.12).



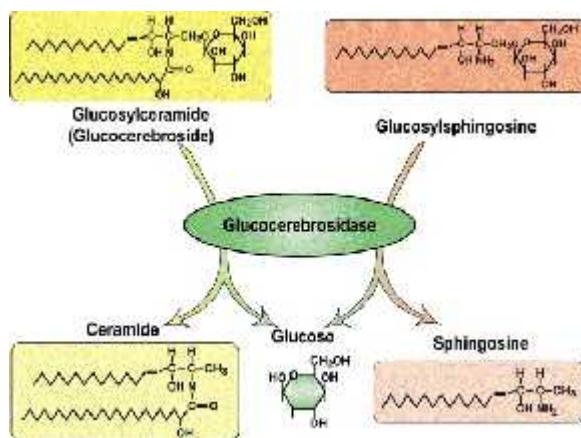
**Slika 12.** Dostupnost različitih glikoformi u krvi (pričinjano kao postotak unesene doze) kroz 24 sata

(faktori rasta sa srednjim i najvećim udjelom sijalinske kiseline su se zadržali u krvi i nakon 24 sata. Plava boja predstavlja galaktoziliranu glikoformu bez sijalinske kiseline. Ta glikoforma i neglikoziliran protein iz *E.coli* su degradirani između 5. i 8. sata. Interesantno je primjetiti kako je prije degradiran galaktoziliran produkt od neglikoziliranog. Graf potvrđuje prethodno navedenu injenicu da sijalinska kiselina odgovara proteolizu i produžuje cirkulacijsko vrijeme glikoproteina u organizmu)

(preuzeto iz Baumaister i Goletz, 2010).

#### 4.2. Primjena glikoinženjeringu i terapije zamjene enzima pri liječenju Gaucherove bolesti

Danas svako 5000. – 10000. novorođeno dijete boluje od jedne lizosomske bolesti pospremanja. Riječ je o skupini bolesti koje karakterizira nakupljanje toksinih metabolita u organizmu zbog nefunkcionalnosti enzima koji ih nisu razgrađuju (http://medicalxpress.com/conditions/lysosomal-storage-disease/). Gaucherova bolest je teški nasljedni poremećaj koji spada u lizosomske bolesti pospremanja, a nastaje mutacijom gena GBA. Normalni produkt gena GBA je enzim β-glukocerebrozidaza koja u lizosomu katalizira reakciju hidrolize glukocerebrozida na glukozu i ceramid (Sl.13).



**Slika 13.** Shematski prikaz reakcije koju katalizira  $\beta$ -glukocerebrozidaza.  
 (prikazana je i hidroliza alternativnog supstrata, glukozilsfingozina, na glukozu i sfingozin)  
 (preuzeto iz Sidransky, 2004)

Nakon što je enzim mutacijom izgubio funkciju, dolazi do toksičnog porasta koncentracije glukocerebrozida najčešće u stanicama makrofaga koji su rasprostranjeni širom organizma i sudjeluju u imunološkom odgovoru. Osim makrofaga, nakupljanje glukocerebrozida može se i u jetri, slezeni, plućima i mozgu, što takođe remeti njihovo normalno funkcioniranje, a u koncu nici ne izaziva tešku oštećenja i smrt (<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/gaucher-disease>). Makar je bolest neizljekiva, pomoći u glikoinženjeringu i terapiji zamjene enzima postižu se odlični rezultati i pacijentima se znatno produžuje život i neutraliziraju simptomi. Rekombinantna  $\beta$ -glukocerebrozidaza sadrži dva N-vezana glikana koji se prije unosa u organizam cijepaju glikozidazom (cijepa se terminalna sijalinska kiselina). Glikani se nakon cijepanja sastoje od 3 terminalne manoze, 2 N-acetylglukozamina i fukoze što olakšava transport  $\beta$ -glukocerebrozidaze u stanice makrofaga gdje uspješno komplementira defektan enzim (Garnier i Reichard, 2005).

## 5. LITERATURA

- Andreis I, Batini D, ulo F, Gr evi D, Lukinovi -Škudar V, Maruši M, Taradi M, Višnji D, 2010. Imunologija. Eds. S.Glamulin, A. Jureti , B. Malenica, Medicinska naklada, Zagreb, pp. 144-155.
- Baumeister H, 2004. Biotopics 24. Eds. C. Puhan, G. Harms, BioTOP Berlin-Brandenburg, Berlin, pp. 10-11.
- Baumeister H, Goletz S, 2010. A matter of cell line development. *European Biopharmaceutical Review* **129**, 54-58.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, 2012. Biochemistry. Eds. S. Moran, A. Baker, N. Tymoczko, D. Goldman, W.H. Freeman and Company, New York, pp. 329-355.
- Bladon C, 2002. Pharmaceutical Chemistry: Therapeutic Aspects of Biomacromolecules. Eds. I. W. Waine, M. Little, John Wiley & Sons LTD, Chichester, pp. 1-6.
- Dennis JW, Nabi IR, Demetriou M, 2009. Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease. *Cell* **139**, 1229-41.
- Garnier P, Reichardt NC, 2005. The Glycosylation of therapeutic proteins. *IPT* **18**, 50-53.
- Freeze HH, Haltiwanger RS, 1999. Essentials of Glycobiology. Eds: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 163-175.
- Kusali T, 2010. Strukturna karakterizacija glikoproteina tehnikama spektrometrije masa, doktorska disertacija, pp. 7-10, 14-18, 25-29, 33-41.
- Nelson D, Cox M, 2008. Lehninger: Principles of Biochemistry. Eds. K. Ahr, R. Rossignol, P. Shriner, P. McCaffrey, E. Geller, B. Moscatelli, W.H. Freeman and Company, New York, pp. 235-270.
- Schwarz F, Huang W, Li C, Schulz BL, Lizak C, Palumbo A, Numao S, Neri D, Aebi M, Wang LX, 2010. A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nat Chem Biol* **6**, 264-6.
- Schwarz F, Aebi M, 2011. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 576-82.
- Sidransky E, 2004. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. *Molecular Genetics and Metabolism* **83**, 6–15.
- Solá R, Greibenow K, 2010. Glycosylation of therapeutic proteins: An effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs* **24**, 9-21.

Xu X, Nagarajan H, Lewis N, et al., 2011. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol* **29**, 735–741

<http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/>

<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/gaucher-disease>

<http://www.legendarypharma.com/glycation.html>

[http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research\\_e.html](http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research_e.html)

[http://medicalxpress.com/conditions/lysosomal-storage-disease/\)](http://medicalxpress.com/conditions/lysosomal-storage-disease/)

## **6. SAŽETAK**

Mnoga impresivna dostignu a terapeutskih proteina u lije enju teških bolesti, ne bi bila mogu a bez glikoinženjeringa. Terapeutski proteini su sami po sebi kratkog vijeka u organizmu i ograni ene su biološke aktivnosti, stoga je nužno uvesti dodatne glikozilacijske mehanizme koji e poboljšati farmakodinami ka i farmakokineti ka svojstva terapeutskih proteina.

U ovom radu su ukratko izloženi osnovni principi glikozilacije proteina u sve tri domene života. Poseban naglasak je stavljen na važnost samog procesa i njegovog utjecaja na stabilnost, strukturu i funkciju (terapeutskih) proteina. Detaljnije su obra eni na ini proizvodnje terapeutskih proteina, problematika glikozilacije humanih proteina u drugim organizmima, te na ini postizanja optimalne glikozilacije i dobivanja proteina željene glicoforme.

Navedeni su brojni primjeri poboljšanja *in vivo* biološke aktivnosti proteina glikoinženjeringom, od hiperglikoziliranog analoga humanog rekombinantnog eritropoetina (NESP-a) do terapeutskih protutijela i  $\beta$ -glukocerbrozidaze.

## **7. SUMMARY**

Many impressive achievements of therapeutic proteins in treating serious illnesses would not be possible without glycoengineering. Therapeutic proteins have a short serum half-life and limited biological activity. That is why it's necessary to include more glycosylation mechanisms which will consequentially enhance the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of therapeutic proteins.

In this paper, the basic glycosylation principles in all domains of life are presented. A special emphasis was given to the importance of the glycosylation process itself on the stability, structure and function of (therapeutic) proteins. In more detail were explained the various methods of synthesis, the problem of glycosylation of human proteins in other organisms and various ways to obtain the wanted glycoform of a therapeutic protein.

There were given many examples of *in vivo* enhancements of protein bioactivity via glycoengineering, from the hyperglycosylated analog of the human recombinant erythropoietin (NESP) to therapeutic antibodies and  $\beta$ -glucocerebrosidase.