Glikozilacija u razvoju novih terapijskih pristupa

Anić, Darija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:458326

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Darija Anić

Glikozilacija u razvoju novih terapijskih pristupa

DIPLOMSKI RAD

Predan Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijkog i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju fakulteta pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Olge Gornik.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Olgi Gornik na stručnom vodstvu, danim savjetima te pomoći u izradi ovog diplomskog rada.

SADRŽAJ

1.UVOD 1
1.1 Glikani kao esencijalne komponente života 2
1.1.1 Važnost glikozilacije 3
1.1.2 N i O-vezani glikoproteini, glikozaminoglikani 4
1.1.3 Važnost glikozilacije u patofiziologiji bolesti 5
1.1.4 Glikan vežući receptori 6
2. OBRAZLOŽENJE TEME 7
2.1 Potencijal glikana kao terapeutika 8
3. MATERIJALI I METODE 9
4. REZULTATI I RASPRAVA 11
4.1 Povijest glikana u medicini 12
4.1.1 ABO sustav krvnih grupa 12
4.1.2 Heparin 13
4.1.3 Razvoj cjepiva 14
4.1.4 Aminoglikozidi 14
4.2 Male glikanske molekule, inhibitori enzima trenutno na tržištu 15
4.2.1 Inhibitori neuraminidaze: Oseltamivir i Zanamivir 15
4.2.2 Inhibitori alfa glukozidaze 17
4.2.3 Miglustat 18
4.2.4 Fondaparinuks 19
4.3 Potencijal upotrebe 3-o sulfatiranog oktasaharida u inhibiciji infekcije HSV-1 ... 20
4.4 Glikanski mimetici u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima 22
4.4.1 C-tip lektina 22
4.4.2 I-tip lektina 26
4.4.3 Bakterijski i virusni lektini 27

4.5 Povijest i budući potencijal polivalentnih glikanskih mimetika 32
4.5.1 STARFISH 32
4.5.2 Dendrimerni glikopolimer etilen oksida 33
4.5.3 Multivalentni glikomimetici, inhibitori DC-SIGNa 34
4.6 Cjepiva bazirana na ugljikohidratima 36
4.6.1 Ugljikohidratne podjedinice kao kandidati za cjepiva 37
4.6.2 Prvo sintetsko cjepivo 38
4.6.3 Sintetski GPI kao cjepivo kandidat kod modela malarije 40
4.6.4 Sintetsko konjugirano cjepivo protiv infekcije Shigellom flexneri 2a 41
4.6.5 Sintetsko glikopeptidno cjepivo kao zaštita od Candide albicans 42
4.6.6 Sintetska glukozaminska cjepiva koja prepoznaju PNAG 44
4.6.7 Razvoj cjepiva usmjerenih na glikopeptidne antigene HIV-a 45
4.6.8 Antitumorska sintetska cjepiva 53
4.6.9 Buduća perspektiva ugljikohidratnih cjepiva 58
4.7 Glikoinženjerstvom proteina do poboljšane efikasnosti i terapijske učinkovitosti 59
4.7.1 N-glikozilacija IgG protutijela 59
4.7.2 Važnost glikozilacije eritropoetina i drugih proteinskih terapeutika 62
4.7.3 Enzimski pristup glikanskoj postekspresiji 63
5. ZAKLJUČAK 64
6. LITERATURA 66
7. SAŽETAK/SUMMARY 77
a. Sažetak 78
b. Summary 79

1. UVOD

1.1 Glikani kao esencijalne komponente života

Glikani su najobilniji i najrazličitiji biopolimeri u prirodi. Sama riječ glikan obuhvaća ugljikohidrate, oligosaharide i polisaharide. U živim organizmima ih možemo pronaći kao velike strukturne polisaharide, izlučene komponente mukusa ili kao konjugate proteina i lipida. Razlikuju se po veličini od jednog monosaharida do polisaharida dugačkog nekoliko tisuća jedinica.(Hudak, Bertozzi., 2014)

Glikani najčešće stvaraju kovalentne veze s proteinima i lipidima te kao takvi značajno doprinose masi i prije svega strukturnim varijacijama u biološkim sustavima. (Ohtsubo, Marth, 2006)

Velikoj raznolikosti glikana doprinosi mogućnost međusobnog vezanja osnovnih jedinica, monosaharida, na razne pozicije njihovih furanoznih ili piranoznih prstenova. Svaki prsten može uspostaviti više veza što doprinosi razgranatosti strukture. U konačnici, strukturna kompleksnost glikana je u velikoj mjeri povećana mogućnošću stvaranja alfa i beta izomera na anomernom centru (centar kiralnosti ostvaren zatvaranjem hemiacetalnog prstena).(Ernst, Magnani.,2009)

Glikobiologija se fokusira na razumijevanje strukture, kemije, biosinteze i biološke funkcije glikana i njihovih derivata. No, poznato je da se kompleksna uloga koju glikani igraju u biologiji počela cijeniti gotovo stoljeće nakon rasvjetljenja struktura monosaharida. Jaz u razumijevanju strukture i funkcije je jednim dijelom posljedica kompleksnosti regulacije i biosinteze ovih biomolekula. Naime, glikani nisu direktno kodirani genomom tako da je njihova biosinteza diktirana metabolizmom, prijenosom signala i celularnim statusom. (Dennis i sur., 2009)

Proteklih godina, kako bi parirao postojećoj genomici, proteomici i lipidomici, razvija se izraz glikomika koji se odnosi na proučavanje strukture glikana koji čine glikom živih organizama. Procjenjuje se da glikom sisavaca sadrži stotine i tisuće različitih struktura te bi mogao biti veći od proteoma. Iako je teoretska mogućnost raznolikosti struktura glikana ogromna, ograničenja su osigurana mehanizmima regulacije i sinteze glikana. Kralježnjaci, osobito sisavci su razvili visoko kompleksan repertoar glikana, strukturno različit onom beskralježnjaka, nižih eukariota i prokariota. Očito je da su varijacije glikoma među organizmima molekularne osnove sustava prepoznavanja između vrsta.

Na primjer, glikani beskralježnjaka mogu modulirati razvoj i aktivaciju imuosnog sustava sisavaca.

Glikani sisavaca su izvanredno dobro očuvani, no specifične varijacije između vrsta također postoje. Smatra se da varijacije uzrokuju različita svojstva između vrsta, uključujući osjetljivost na različite infektivne patogene. (Ohtsubo,Marth.,2006) Kemijskim inženjeringom možemo modifikacirati glikane živih stanica što u velikoj mjeri može unaprijediti mogućnost detekcije funkcije glikana i doprinjesti budućim dijagnozama i tretiranju različitih bolesti.(Prescher i sur.,2004)

1.1.1 Važnost glikozilacije

Glikani prekrivaju površinu svih stanica sisavaca, a proces dodavanja glikana na proteinske i lipidne okosnice naziva se glikozilacija. Glikozilacija proteina je najzastupljenija posttranslacijska modifikacija i osnovna je odrednica aktivnosti i funkcije proteina. Procjenjuje se da je više od 50% proteina sisavaca glikozilirano te nije nimalo začuđujuća činjenica da su glikoproteini uključeni u koordinaciju većine unutarstaničnih i među-staničnih procesa. Funkcija glikana u migraciji imunosnih stanica kroz tijelo, uloga u staničnoj diobi, migraciji, adheziji, interakcijama s patogenom te enzimskoj katalizi je neupitna. Glikozilacija je također vrlo bitan element patofiziologije različitih bolesti (karcinom, autoimune bolesti, dijabetes, Alzheimerova bolest, hematološki poremećaji i alergije) o čemu će biti govora u nastavku.(Partie i sur., 2013)

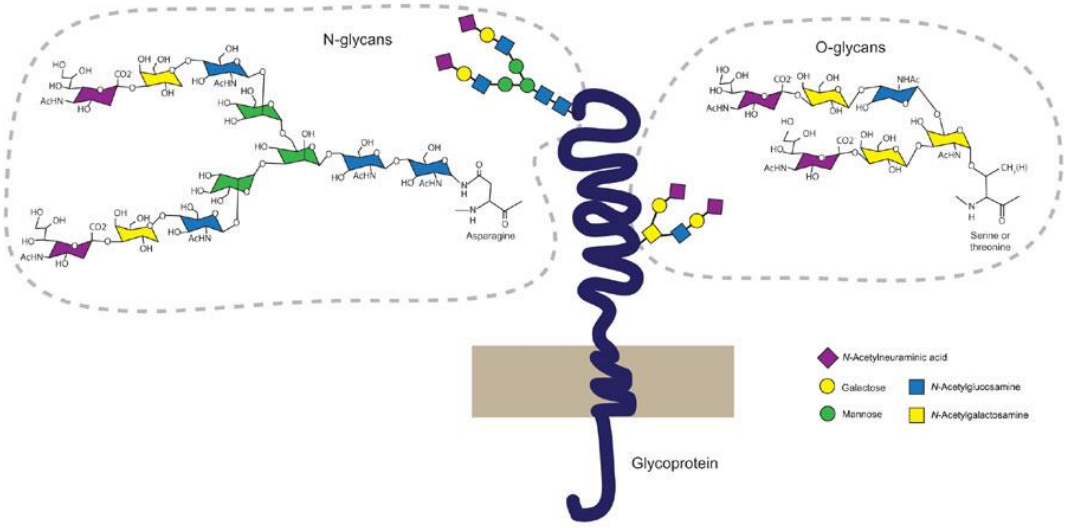
Enzimi uključeni u proces glikozilacije su glikoziltransferaze i glikozidaze. Glikoziltransferaze kataliziraju prijenosšećera s nukleotidnog šećernog donora na supstrat dok glikozidaze kataliziraju hidrolizu glikozidnih veza u strukturi glikana. Geni koji kodiraju za enzime glikozilacije obuhvaćaju više od 1% ukupnog genoma. Do danas je klonirano više od 100 gena za glikoziltransferaze i glikozidaze koji doprinose selektivnom dodavanju ili uklanjanju pojedinih monosaharida s rastuće strukture glikana. Ekspresija navedenih enzima je visoko regulirana ovisno o metabolizmu stanice, aktivaciji, mikrookolišnim promjenama i starenju. Sama glikozilacija daje različite strukturne varijacije određenog proteina, glikoforme. Izraz glikoforma se odnosi na različite izoforme proteina ovisno o broju i strukturi dodanih glikana. Različite glikoforme proteina mogu drastično promijeniti biološka i fiziološka svojstva proteina. (Van Kooyk, Rabinovich.,2008)

1.1.2 N i O-vezani glikoproteini, glikozaminoglikani

Proteini na koje je vezan ugljikohidratni lanac uglavnom se izlučuju ili su smješteni na staničnoj površini, premda su mnogi jezgreni i citosolni proteini također glikozilirani. Glikani imaju značajnu ulogu u smatanju proteina u endoplazmatskom retikulumu, u usmjeravanju proteina u odgovarajuće stanične odjeljke te kao mjesta prepoznavanja u međustaničnim interakcijama.(Cooper, Hausman, 2004)

Ovisno o mjestu vezanja ugljikohidratnog bočnog lanca razlikujemo N-vezane i O-vezane glikoproteine. Kod N-vezanih glikoproteina , glikan je vezan na dušikov atom bočnog ogranka asparagina(smještenog unutar slijeda Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr, gdje je X bilo koja aminokiselina osim treonina), dok je kod O-vezanih glikoproteina vezan na serin ili treonin.(Slika 1.) Šećeri koji se izravno vežu na te položaje su N-acetilglukozamin(N-vezani šećeri) i N-acetilgalaktozamin(O-vezani šećeri).

Mnogi citoplazmatski i jezgreni proteini,uključujući transkripcijske faktor, modificirani su dodatkom jednog O-vezanog N-acetilglukozaminskog ostatka. Proteini modificirani lancima glikozaminoglikana(GAG) su poznati kao proteoglikani. GAG su linearni polimeri koji sadrže amino šećere(N-acetilglukozamin i N-acetilgalaktozamin) i uronske kiseline(glukuronska ili iduronska kiselina). Ovisno o strukturi i modifikacijama GAG-a razlikujemo heparin, heparan sulfat, kondroitin sulfat,dermatan sulfat i hijaluronan. GAG se sintetiziraju postepenim dodavanjem pojedinih monosaharida na serinske ostatke.(Cooper, Hausman, 2004.)



Slika 1. Prikaz N-glikana i O- vezanog glikana
(http://www.nature.com/ni/journal/v9/n6/fig_tab/ni.f.203_F1.html)

1.1.3 Važnost glikozilacije u patofiziologiji bolesti

Dinamična intracelularna glikolizacija proteina N-acetil glukozaminom plijeni pažnju medicinskog društva zbog promjene regulacije u karcinomu, dijabetesu, pretilosti i Alzheimerovoj bolesti. (Bond, Hanover., 2013)

Modifikacija O-GlcNAcilacijom je kontrolirana enzimima polipeptidil transferazom(OGT) koja dodaje O-GlcNAc sa serinskih i treoninskih ostataka te OGA enzimima kojiga uklanjaju. Iako je regulacija ovih enzima malim molekulama tek u začetku, laboratorij Davida Vocadla je razvio selektivni nisko molekularni inhibitor OGA, tiamet-G. (Hudak, Bertozzi.,2014)

Liječenje glodavaca tiametom-G je uzrokovalo smanjenje gubitka neuralnih stanica u mišjem modelu Alzheimerove bolesti. Naime, oligomerizacija tau proteina je ključan proces koji doprinosi progresivnoj smrti neurona u Alzheimerovoj bolesti. Tau se modificira O-vezanim N-acetilglukozaminom koji u određenim slučajevima može utjecati na fosforilaciju tau proteina(hiperfosforilacija tau proteina je bitna karakteristika Alzheimerove bolesti). Postoji recipročni odnos između fosforilacije i modifikacije proteina N-acetil glukozaminom, također je pronađena smanjena razina N-acetil glukozamina na tau proteinima mozga oboljelog od Alzheimerove bolesti. Donesen je zaključak kako povećane razine glikoziliranog tau proteina može biti strategija kojom će se stvoriti barijera u patološkoj tau induciranoj neurodegeneraciji. Nađeno je da se liječenjem transgeničnih miševa s inhibitorima OGA (opisan je racionalni dizajn i sinteza takvog inhibitora, tiamet-G) povećao stupanj glikoziliranosti tau proteina što je smanjilo formaciju tau agregata i stupanj gubitka neuralnih stanica. Tiamet G je u in vivo istraživanjima smanjio fosforilaciju tau proteina u PC-12 stanicama na patološki bitnim mjestima uključujući Thr231 i Ser396, također je efikasno smanjio fosforilaciju u korteksu i hipokampusu štakora što dokazuje brzu i dinamičnu vezu između fosforilacije tau proteina i N-acetil- glukozamina in vivo. (Yuzwa i sur., 2008) Rezultati in vitro agregacijskih studija pokazuju da N-acetil glukozamin također inhibira termalno induciranu agregaciju TAK-1 vežućeg proteina(nepovezanog sa Alzheimerovom bolešću) što otvara mogućnost pretpostavke kako bi osnovna biokemijska funkcija O-vezanog N-acetil glukozamina mogla biti prevencija agregacije proteina. Rezultati istraživanja također opisuju enzim OGA kao potencijalnu metu terapeutika čija inhibicija može blokirati progresiju Alzheimerove bolesti. (Yuzva i sur., 2012)

1.1.4 Glikan vežući receptori

Velik broj eukariotskih i prokariotskih patogena na površini stanica ili na površini izlučenih produkata eksprimiraju glikokonjugate. Glikani koje sintetiziraju određeni patogeni (npr. Meningokoki Trypanosoma i Helicobacter) mogu uključivati terminalne strukture vrlo slične nađenima u glikanima sisavaca. Međutim, neki patogeni, uključujući Shistosoma Mansoni i Mycobacterium Tuberculosi eksprimiraju specifične glikanske epitope. (Van Die, Cummings., 2006)

Na površini stanica imunosnog sustava postoje različiti receptori koji vežu glikane, lektini. Prepoznaju specifične glikane na okosnicama proteina i lipida, visoko su selektivni te mogu poslužiti za proučavanje varijacija glikana. Interakcije glikana i lektina obično su manjeg afiniteta od protein-protein interakcija no postoji visoka specifičnost kojom lektini vežu više dijelova glikana. Glikani na području glikokaliksa mogu dostići milimolarne koncentracije te je vrlo teško glikanskim mimeticima poremetiti njihove interakcije s lektinskim receptorima. Nedavna istraživanja pokazuju neočekivanu selektivnost prema istim glikanskim ligandima prezentiranim na različitim glikoproteinima što implicira utjecaj komformacije i različite aminokiselinske sekvence na afinitet lektina prema glikanskom ligandu. Svi lektini sadrže jednu ili više domena za prepoznavanje glikana (CRD domene) koje su odgovorne za vezanje glikana. (Ohtsubo, Marth.,2006)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

2.1 Potencijal glikana kao terapeutika

Iako dugo zanemarivani, danas je poznato da glikani igraju važnu ulogu u brojnim biološkim događajima, uključujući adheziju i migraciju stanica, razvoj organizma, razvoj bolesti i modulaciju imunološkog odgovora. U proučavanje glikana i njihov utjecaj na bolesti uloženo je mnogo napora, no oni su u prošlosti bili vrlo rijetko uzeti u obzir kao mete za razvoj novih lijekova. Napretkom metoda sinteze ugljikohidrata te njihove analize, situacija se počela polako mijenjati i nakon desetljeća istraživanja, znanstvenici stvaraju poboljšane ili nove glikane kojima je cilj kontrola ljudskog zdravlja i bolesti. Područje glikoinženjerstva je,iako jošu velikoj mjeri neistraženo, postalo područje s velikim potencijalom stvaranja novih lijekova i različitih pristupa liječenja. (Hudak, Bertozzi., 2014)

Tako je do danas identificiran velik broj receptora koji vežu glikane, rasvijetljene su specifičnosti vezanja većine njih, dok se za ostale trenutno određuju epitopi za njihovo vezanje. Navedena otkrića su dovela do renesanse u glikobiologiji jer osiguravaju stalan izvor meta za dizajn novih kemijskih entiteta koji će oponašati bioaktivne ugljikohidrate i strukturno odgovarati vežućem mjestu na meti. Drugim riječima, dolazi do razvitka nove skupine terapeutika.Unatoč važnosti glikana u mnogim biološkim procesima, oni pokrivaju samo usko područje u svijetu terapeutika te je potrebno pronaći ostatak patofiziološki važnih interakcija ugljikohidrata i proteina. (Ernst, Magnani.,2009)

Cilj ovog rada je istaknuti postignuća na području dizajna terapeutika baziranih na ugljikohidratima, posvetiti pažnju trenutno odobrenim glikanskim terapeuticima na tržištu kao i onima u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima. Poseban naglasak će biti stavljen na nove strategije u terapiji i nove glikanske terpeutike koji bi u budućnosti trebali uvelike unaprijediti liječenje različitih bolesti.

3. MATERIJALI I METODE

Pretraživanje literature online baza podataka obavljeno je elektroničkim putem pomoću umreženog računala koje ima online pristup bazama podataka. Pretražena je bibliografska baza podataka (PubMed).

Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, autorima,časopisu. Pri pretraživanju literature korištene su sljedeće ključne riječi : glycotherapy, lectins, glycosylation, glycomimetics, glycoscience, glycopeptide vaccines, antitumoral synthetic vaccines, sugar mimic, glycans in medicine, bnAbs, glycoengineering, IgG glycosylation, erythropoietin glycosylation...

Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku ovoga diplomskog rada. Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku ovoga diplomskog rada.

Relevantni članci proučavani su analitično i kritično, a vezano uz: definiranje znanstvenog i/ili stručnog problema, istraživanje postojećih znanja o definiranom problemu (literaturni navodi), oblikovanje radne hipoteze, odabir eksperimentalnih metoda za ispitivanje hipoteze, prikaz i analizu rezultata te izvedene zaključke. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci, koji su prikazani ovim diplomskim radom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Povijest glikana u medicini

Kao proteini i DNA, glikani također imaju bogatu povijest korištenja u medicini. Međutim, otkrićem genetskog koda i DNA tehnologija, glikani i lipidi postaju manje cijenjeni kao manje bitne sastavnice života. No, ovaj kratak propust nije smanjio njihovu važnost ili potencijal novih terapeutika.(Marth., 2008)To je pogotovo vidljivo rastom pretilosti i dijabetesa tipa 2 gdje je uloga lipida i glikana esencijalna za razumijevanje i liječenje ovih rastućih epidemija.(Smyth, Heron.,2006) Ovaj dio rada će se fokusirati na pojavljivanje glikana kao primjenjivih terapija na klinici, koji su omogućili neke od prvih velikih otkrića u modernoj medicini.

4.1.1 ABO sustav krvnih grupa

Davne 1900-te, Karl Landsteiner je prijavio otkriće tri krvna tipa, A, B i O što je omogućilo provjeru kompatibilnosti donora i primatelja te posljedično prvu uspješnu transfuziju,1907. godine. Ovo otkriće mu je 1930. donijelo Nobelovu nagradu, no strukture ABO sastavnica su otkrivene tek 50-tak godina kasnije. Studije, kojima je cilj bio utvrditi kemijske identitete različitih krvnih tipova, nisu bile plodne do 1950-ih godina kada su otkrivene ciste jajnika kao izvor velike količine aktivnih spojeva. Također su otkriveni biljni lektini koji aglutiniraju specifične stanice krvnih grupa. Sredinom dvadesetog stoljeća je demonstrirana glavna sastavnica H antigena, monosaharid fukoza na koju se dodaje N-acetilgalaktozamin ili galaktoza, ovisno dali se radi o A ili B antigenu. Cijela struktura antigena je rasvijetljena 1960-ih upotrebom selektivne alkilacije u kombinaciji s kiselom/bazičnom hidrolizom kako bi se odredile komponente i veze između monosaharida. (Hudak, Bertozzi., 2014)

4.1.2 Heparin

Pentasaharid heparin je antikoagulans koji se koristi u prevenciji i liječenju duboke venske tromboze i plućne embolije. Njegovo otkriće i upotreba imaju značajan i dugotrajan utjecaj na medicinu i terapiju. Heparin je otkriven 1916. U klinici se počinje koristiti 1930-ih uslijed napretka u izolaciji iz animalnih izvora. Od sredine dvadesetog stoljeća većina industrijski proizvedenog heparina bila je izolirana iz svinjske mukoze. Godišnje se iz animalnih izvora dobije oko 100 tona heparina. (Hudak, Bertozzi., 2014)

Istraživanja mehanizma djelovanja heparina dovela su do otkrića antitrombina koji je neophodan za inhibiciju zgrušavanja inicijatora kaskade, trombina i faktora Xa. Naime, heparin se veže za antitrombin i pojačava mu aktivnost. Vezanjem heparina dolazi do promjena u konformaciji antitrombina što posreduje inhibiciju faktora Xa. Međutim, za inhibiciju trombina, pentasaharid heparina također mora obuhvatiti i vezati trombin. Visoko negativna gustoća naboja heparina doprinosi snažnim elektrostatskim interakcijama sa trombinom. Aktivirani antitrombin inhibira faktor Xai trombin. (Chuang i sur., 2001.)

Struktura bazične disaharidne jedinice heparina rasvijetljena je tek nekoliko godina kasnije. Heparin je identificiran kao glikozaminoglikan koji se sastoji od sulfatiranog glukozamina i iduronske kiseline. (Hudak, Bertozzi., 2014)

Zanimljivo je otkriće skladištenja endogenog heparina unutar sekretornih granula mastocita i otpuštanje na mjestima ozljede tkiva. Predložena je imunološka funkcija heparina, obrana od invazivnih bakterija i drugih stranih materijala na oštećenim mjestima. Prednost imunološkoj funkciji pred antikoagulacijskom daje činjenica pronalaska heparina među različitim vrstama, uključujući i beskralježnjake koji nemaju sličan sustav koagulacije.(Humphries i sur., 1999.)

Gore navedena otkrića, zajedno sa značajnim kliničkim uspjehom, učinili su heparin milijun-dolarskom industrijom i bogatim izvorom daljnjih istraživanja.

4.1.3 Razvoj cjepiva

Davne 1917, Dochez i Avery su izvijestili da postoji specifična topljiva supstancija, uzeta iz Pneumococcusa, koja može reagirati sa specifičnim antiserumom pacijenata zaraženim patogenom.(Dochez i Avery., 1917).

Pet godina kasnije donesen je zaključak da se radi o polisaharidnoj tip-specifičnoj topljivoj supstanciji. Nakon prvotnog skepticizma identificirano je da kapsularni polisaharid može biti korišten kao glavna komponenta za razvitak cjepiva protiv Pneumococcusa. (Heidelberger, 1950)

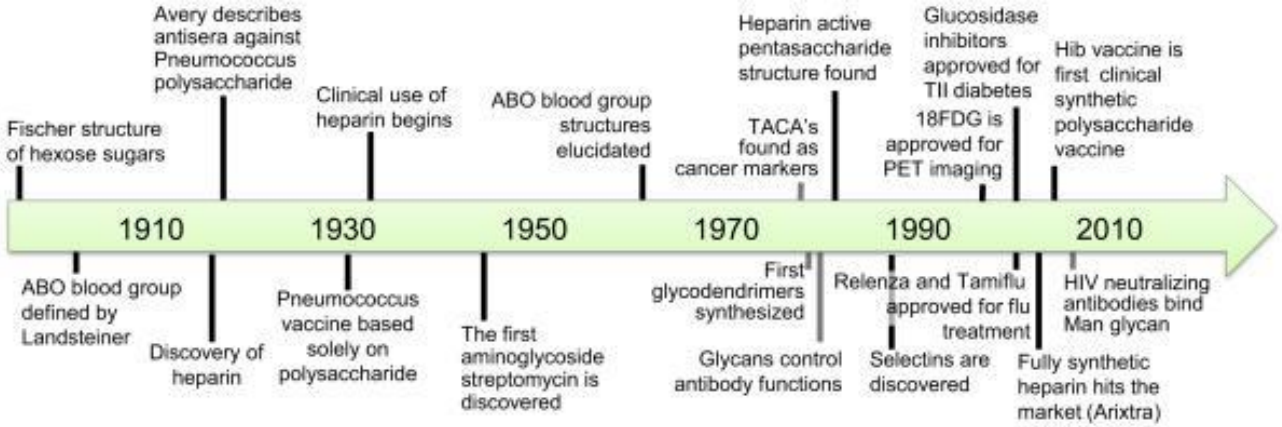
Terapeutici bazirani na gore spomenutom polisaharidu koristili su se u cjepivu Pneumovax (PPV23) koji sadrži 23 pročišćena kapsularna polisaharida iz Streptococcus Pneumonia.

Iako je mali broj polisaharida podrijetlom iz drugih patogena vakcinacijom osigurao adekvatan odgovor antitijela, navedena otkrića su dokazala da ugljikohidrati mogu biti vrlo uspješna cjepiva. Mogućnost korištenja ugljikohidrata kao cjepiva bio je poticaj za istraživanje daljnje upotrebe ugljikohidrata. (Hudak, Bertozzi., 2014)

4.1.4 Aminoglikozidi

Aminoglikozidi su antibakterijski terapeutici koji uglavnom djeluju na gram negativne aerobne bakterije. Radi se o malim molekulama glikana koje sadrže amino skupine. Svojim kompleksnim sekundarnim metabolizmom ih sintetiziraju gram pozitivne bakterije roda Streptomyces i Micromonospora. Prvi aminoglikozid, streptomicin, otkriven je 1943. godine. Pokazao se vrlo koristan u kliničkoj praksi kao prvi antibiotik koji je uspješno liječio tuberkulozu. U skupinu antibiotika aminoglikozida također spadaju Gentamicin, Kanamicin, Neomicin, Tobramicin i Amikacin. (Hudak, Bertozzi.,2014)

Primarni mehanizam djelovanja aminoglikozida je inhibicija sinteze proteina. Naime oni onemogućuju pravilno kodiranje mRNA(antikodon prepoznaje i veže krivi kodon), dolazi do ugradnje pogrešnih aminokiselina u rastući polipeptidni lanac i posljedična sinteza nefunkcionalnih ili toksičnih proteina. Nažalost, brz početak bakterijske rezistencije doveo je do stalnog pada njihove kliničke upotrebe. Sve veći broj višestruko otpornih sojeva potaknuo je interes za traženje novih spojeva meta kako bi se onemogućila rezistencija. (Becker, Cooper., 2013)



Slika 2. Vremenska crta upotrebe glikana u medicini
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111574/figure/F1/)

4.2 Male glikanske molekule, inhibitori enzima trenutno na tržištu

4.2.1 Inhibitori neuraminidaze: Oseltamivir i Zanamivir

Virus influence je RNA virus koji spada u skupinu Orthomyxoviridae. Većinu infekcija kod ljudi izazivaju podtipovi A i B. Navedeni virusi su odgovorni za sezonsku gripu, izazivajući epidemije i mnogo rjeđe, potencijalno razarajuće pandemije. RNA lanac influence tipa A sadrži osam segmenata gena koji kodiraju za 11 proteina, uključujući glikoproteine hemaglutinin (HA) i neuraminidazu (NA). Virus influence koristi HA kako bi se pričvrstio na ostatke sijalinske kiseline (N-acetilneuraminske kiseline) stanice domaćina, što inicira infekciju. Jednom kada je stanica inficirana, virus se replicira koristeći sustav za replikaciju stanice domaćina te isključuje transkripciju i translaciju stanice domaćina(geni domaćina su suprimirani, pogotovo oni odgovorni za imunost). Dolazi do direktnog nekrotičkog efekta na stanice respiratornog sustava. (Kamali, Holodny., 2013)

Neuraminidaza je zaslužna za otpuštanje virusa i širenje infekcije te za cijepanje sijalinskih ostataka na stanici domaćina.

Dok je vakcinacija vrlo bitna za prevenciju bolesti, antivirusna terapija je u prvom planu liječenja i također je vrlo bitna u prevenciji. Trenutno za liječenje postoje dvije skupine lijekova, adamantani i inhibitori neuraminidaze. Zbog česte rezistencije, adamantani nisu preporučeni.

U Hrvatskoj su za prevenciju i liječenje odobreni Zanamivir i Oseltamivir, najuspješniji lijekovi dobiveni modifikacijom šećernih dijelova. Inhibicijom virusne neuraminidaze (enzima koji cijepa sijalinsku kiselinu) onemogućuju otpuštanje viriona iz stanica domaćina kao i ulazak virusa u stanice.(Kamali, Holodny., 2013)

Zanamivir je prvi razvijen inhibitor neuraminidaze za liječenje i profilaksu influence. Pokazuje veći afinitet prema neuraminidazi od nativne N-acetilneuraminske kiseline. Zbog velike polarnosti, oralna bioraspoloživost je prilično niska tako da se primjenjuje inhalacijski i intravenozno.

Oseltamivir je razvijen prema strukturi aktivnog mjesta zanamivira te se primjenjuje kao prolijek koji se u jetri prevodi u svoj aktivni oblik. Kao i zanamivir, registriran je za liječenje i profilaksu influence.

Rezistencija na oseltamivir je česta kod ponovnog uzimanja, no isto tako se može javiti i kod pacijenata koji prethodno nisu izlagani inhibitorima neuraminidaze.(Kamali, Holodny., 2013)

Rezistencija na inhibitore neuraminidaze je posredovana mutacijama koje mijenjaju konformaciju aktivnog mjesta NA, što vodi ka smanjenom vezanju inhibitora. Uzrok rezistencije također mogu biti promjene u slijedu aminokiselina NA, što smanjuje mogućnost interakcije s lijekom. Ovisno o interakciji lijeka i neuraminidaze, različite promjene mogu dovesti do različite osjetljivosti ili rezistencije na lijek. (Samson i sur., 2013)

Idealna bi bila maksimalna moguća sličnost lijeka sa prirodnim produktom(sijalinskom kiselinom), no neke promjene su neophodne kako bi se osigurala zadovoljavajuća apsorpcija i retencija lijeka. Općenito, većina rezistencije je zabilježena kod Oseltamivira dok je relativno malo sojeva rezistentno na Zanamivir. Moguć razlog tomu je veća sličnost Zanamivira prirodnom supstratu. Međutim, upotreba Oseltamivira je ipak mnogo češća.

S obzirom na limitiranost trenutne terapije (način primjene i rezistencija), javlja se sve veća potreba za razvojem novih terapeutika, inhibitora neuraminidaze. Znanstvenici se koriste QSAR-om (kvantitativni odnos strukture i aktivnosti) kako bi se modelirali novi potencijalni inhibitori neuraminidaze. Sintetizirani su analozi zanamivira, npr. lanimavir (odobren samo u Japanu). Trenutno se evaluiraju brojni drugi spojevi koji bi čvršće vezali neuraminidazu i time omogućili bolju efikasnost. S obzirom da neuraminidaze na površini stanica viriona tvore tetramere, postoji rastući interes u pronalasku spojeva koji bi vezali više neuraminidaza na površini viriona. Takvi spojevi bi imali veći afinitet vezanja i poboljšanu farmakokinetiku, što bi dovelo do veće potentnosti. (Kamali, Holodny., 2013)

Kim i suradnici su istraživali derivate 2,3 difluorsijalične kiseline kao potencijalne terapaeutike. Ovi spojevi su vrlo atraktivni jer imaju visok afinitet vezanja za neuraminidazu te sporo disociraju s receptora, što dovodi do prolongirane inaktivacije neuraminidaze te veoma dugog vremena poluživota.

U budućnosti će ovi i slični lijekovi sve više dobivati na važnosti zbog rastuće rezistencije sojeva virusa influence na trenutne terapeutike. (Kim i sur.,2013.)

4.2.2 Inhibitori alfa glukozidaze

Sljedeći vrlo uspješni glikanski farmaceutici obuhvaćaju terapeutike koji se koriste u liječenju diabetes mellitusa tipa 2, inhibitore alfa glukozidaze: miglitol, akarbozu i voglibozu.(Hudak, Bertozzi., 2014) Njihova učinkovitost, sigurnost, podnošljivost, kardiovaskularne prednosti i izostanak hipoglikemije čini ih prikladnim za liječenje dijabetesa. Inhibitori alfa glukozidaze se mogu koristiti kao monoterapija, dio kombinirane terapije sa oralnim antidijabeticima i inzulinom te kao fiksna kombinacija doze.

Akarboza je kompleksni oligosaharid koji, kao i ostali inhibitori alfa glukozidaze, usporava probavu unesenih ugljikohidrata, što rezultira manjim porastom koncentracije glukoze u krvi nakon obroka. Kao posljedica redukcije glukoze u plazmi dolazi do smanjenja koncentracije glikoziliranog hemoglobina u pacijenata sa diabetes mellitusom tipa 2. Sistemska, ne enzimska glikozilacija proteina, koja rezultira povećanom razinom glikoziliranog hemoglobina, je funkcija prosječne koncentracije glukoze u krvi kroz duže vrijeme. Za razliku od većine ostalih skupina antidijabetika, akarboza ne povećava sekreciju inzulina. (http://www.drugs.com/) Antihiperglikemični učinak postiže kompetitivnom, reverzibilnom inhibicijom pankreatične alfa amilaze i membranski vezanih intestinalnih hidrolitičkih enzima, alfa glukozidaza. Pankreatična alfa amilaza hidrolizira kompleksne polisaharide do oligosaharida u lumenu tankog crijeva, dok alfa glukozidaza hidrolizira oligosaharide, disaharide i trisaharide u četkastoj prevlaci tankog crijeva. Akarboza, uz alfa glukozidazu, inhibira i alfa amilazu te na taj način utječe na apsorpciju škroba i ostalih ugljikohidrata. Nasuprot tomu, vogliboza i miglitol vrlo dobro inhibiraju enzime za razgradnju disaharida, no nemaju nikakvog učinka na alfa amilazu, enzim koji razgrađuje škrob.

U pacijenata s dijabetesom inhibicija navedenih enzima rezultira usporenom apsorpcijom glukoze i smanjenjem postprandijalne hiperglikemije, što omogućuje bolju kontrolu dijabetesa. (Kalra, 2014)

Zbog različitog mehanizma djelovanja učinak inhibitora alfa glukozidaze, u kontroli glikemije, aditivan je sulfonilurejama, inzulinu ili metforminu kada se koristi u kombinacijama. Iako postoji percepcija o inhibitorima alfa glukozidaze kao manje potentnim lijekovima, rezultati kliničkih istraživanja pokazuju suprotno. Meta analize ističu efikasnost ovih lijekova. Zapravo, njihov mehanizam djelovanja ih čini preferiranim lijekovima u kontroli dijabetesa među populacijom dijabetičara koji konzumiraju ugljikohidrate.

Uzrok česte neadherentnosti su gastrointestinalne nuspojave (česti abdominalni bolovi, dijareja i flatulencija). (http://www.drugs.com/)

4.2.3 Miglustat

Miglustat (N-butil-deoksinojirimicin) je lijek razvijen za liječenje Gaucherove bolesti tipa I. Gaucherova bolest je vrlo rijetki nasljedni poremećaj (autosomno- recesivno nasljeđivanje), urođena greška u metabolizmu glikosfingolipida koju povezujemo sa brojnim sistemskim manifestacijama. Bolest obilježava nakupljanje masti (glukocerebrozida) u stanicama monocitno-makrofagnoga sustava. Osnovni patofiziološki mehanizam je nedostatak enzima glukocerebrozidaze koja hidrolizira glukozilceramid u glukozu i ceramid, što posljedično vodi nakupljanju glukozilceramida u lizosomima retikulo-endotelnoga sustava. Bolest se tradicionalno dijeli u tri oblika, ovisno o zahvaćenosti središnjega živčanog sustava (ne-neuropatski tip I, te neuropatski tipovi II i III). Tip I je najčešći oblik ove bolesti i smatra se odgovornim za oko 94% slučajeva bolesti. Obilježen je hepatosplenomegalijom, promjenama u krvnoj slici, te zahvaćenošću koštano-zglobnog sustava. (Štimac, Mikolašević.,2013)

N-butil-deoksinojirimicin je oralno aktivan imuno šećer koji inhibira biosintezu supstrata (glukocerebrozida) koji se patološki akumulira u glikosfingolipidozama. N-alkilirani je analog deoksinojirimicina koji je prirodni inhibitor glukozil-transferaze uključene u biosintezu glukozilceramida. (Hudak, Bertozzi., 2014) Klinička istraživanja pokazuju terapeutski potencijal inhibitora formacije supstrata u bolestima pohrane glikolipida.(Cox i sur., 2003)

Dakako, enzimska nadomjesna terapija (rekombinantno dobivena glukocerebrozidaza-imigluceraza) je prva linija u liječenju Gaucherove bolesti te se terapija redukcije supstrata (miglustat) koristi za blaže oblike Gaucherove bolesti i kada enzimska nadomjesna terapija iz nekog razloga nije moguća. Miglustat se također koristi kao terapija održavanja nakon postizanja terapijskih ciljeva.

Inhibicaja formacije supstrata miglustatom,osim u Gaucherovoj bolesti,ima nezanemariv terapeutski potencijali u drugim glikosfingolipidozama. Terapija miglustatom je obećavajuća u brojnim neurodegenerativnim bolestima pohrane glikosfingolipida.

Nedavno rađena klinička ispitivanja su pokazala njegovo bitnu ulogu u liječenju Niemann-Pickove bolesti tipa C.

Također, miglustat pokazuje sinergizam sa drugim terapeutskim modalitetima tako da je otvorena mogućnost miglustata kao bitne komponente u kombiniranim terapijama. (Platt, Jeyakumar., 2008)

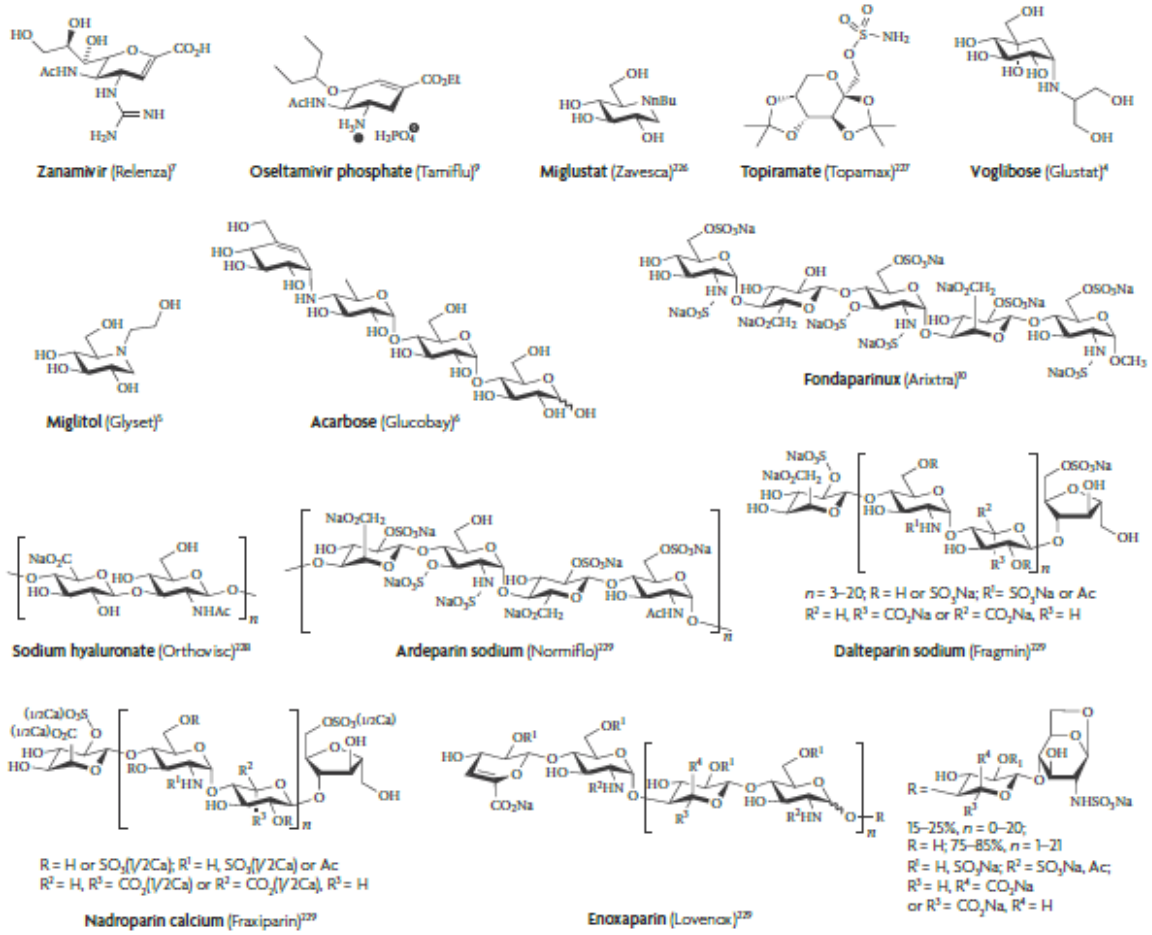
4.2.4 Fondaparinuks

Glikozaminoglikani su skupina visoko nabijenih linearnih polisaharida, pronađeni su na površini stanica i igraju bitnu ulogu u fiziologiji i razvoju. Strukturno rasvjetljenje najpoznatijeg glikozaminoglikana, heparina, 1982., omogućilo je sintezu potpuno aktivnog pentasaharida heparina samo godinu kasnije. (Hudak, Bertozzi., 2014)

Postignuti napredak u sintezi pridonio je razvoju fondaparinuksa. Fondaparinuks je sintetski glikan koji sadrži istu sekvencu pentasaharida nađenu u nefrakcioniranom heparinu. Odobren je u profilaksi duboke venske tromboze kod pacijenata sa frakturom kuka te kod ugradnje umjetnog koljena ili kuka, za profilaktičku primjenu nakon abdominalne operacije te za liječenje akutne venske tromboze i plućne embolije. Duže vrijeme poluživota fondaparinuksa (17-21 sat) omogućuje primjenu jednom dnevno. (Papadopoulos i sur., 2007.)

Bitna prednost fondaparinuksa s obzirom na heparin je njegova veća učinkovitost i manja vjerojatnost izazivanja trombocitopenije inducirane heparinom. Naime, heparinom inducirana trombocitopenija (HIT) je imuno posredovana komplikacija u kojoj broj trombocita može pasti ispod $100 \times 10^3/mm^3$ ili na manje od 50% bazne vrijednosti. Najčešće se detektira 5-10 dana nakon početka korištenja heparina, dok nastup može biti mnogo brži (nekoliko sati) ukoliko je pacijent ranije bio izložen heparinu (u cirkulaciji su već prisutna antitijela).

Ova imuno posredovana trombocitopenija se javlja u približno 3% pacijenata na terapiji nefrakcioniranim heparinima. (Papadopoulos i sur., 2007.)



Slika 3. Strukture trenutno odobrenih glikanskih terapeutika (Ernst, Magnani; From carbohydrate leads to glycomimetic drugs, Figure 1)

4.3 Potencijal upotrebe 3-o sulfatiranog oktasaharida u inhibiciji infekcije HSV-1

Heparan sulfat je visoko sulfatirani polisaharid u velikoj mjeri eksprimiran na staničnoj površini i u ekstracelularnom matriksu. Herpes simpleks virus tipa 1 (HSV-1) koristi specijalizirane heparan sulfate na površini stanica (poznate kao 3-o-sulfatirani heparan sulfati) kao receptore ulaska, kako bi uspostavio infekciju. (Shukla, Spear., 2001)

Upotreba 3-o-sulfatiranog oktasaharida, koji oponaša aktivnu domenu receptora ulaska, pokazala se kao dobar pristup u inhibiciji infekcije herpes simpleks virusom. (Copeland i sur., 2008.)

HSV-1 pripada alfa herpes virusima. Infekcija je vrlo učestala kod ljudi, izaziva lokalizirane i rekurentne mukokutane lezije i u vrlo rijetkim slučajevima encefalitis. (Corey, Spear., 1986)

Heparan sulfati na površini stanica domaćina igraju bitnu ulogu u vezanju virusa, kao i u induciranju virusnog ulaska u ciljanu stanicu. Proces vezanja primarno uključuje interakciju između heparan sulfata i glikoproteina virusne ovojnice, gC i/ili gB. Vezanje slijedi ulazak virusa u ciljanu stanicu, interakcijom sa specifičnim staničnim receptorima ulaska, kako bi se uspostavila infekcija. Poznate su tri skupine receptora ulaska HSV-1. Sve tri skupine stupaju u interakciju sa proteinom ovojnice virusa, gD. HVEM (medijator ulaska herpes virusa) i nektin 1 predstavljaju dvije skupine tih receptora i spadaju u TNF receptore (receptore faktora nekroze tumora). 3-O- sulfatirani heparan sulfat predstavlja treću skupinu receptora ulaska. Receptor je jedinstven jer je polisaharid i sadržava specifičan slijed glikanskih jedinica. Daljnja analiza strukture gD vežućeg oligosaharida je pokazala da vezanje heparan sulfata na gD zahtjeva 3-O-sulfatiranu jedinicu glukozamina.

Istraživanja su se fokusirala na identifikaciju specifične strukture heparan sulfata kako bi se inhibirala infekcija herpesom. Publicirani su brojni radovi na temu korištenja sulfatiranih spojeva, pogotovo sulfatnih polimera, u cilju blokade infekcije herpesom. Međutim, sulfatirani polimeri, koji su strukturno heterogeni, mogu se vezati na raznolike fiziološki bitne proteine čime je povećan rizik toksičnosti za domaćina. (Copeland i sur., 2008.)

Nadalje je istražena mogućnost inhibicije infekcije herpes virusom ciljanjem na gD posredovan korak membranske fuzije koji je neophodan za penetraciju virusa. Inhibicija je postignuta korištenjem 3-O-sulfatiranog oktasaharida heparina koji uspješno oponaša gD-vežuće mjesto polisaharida, 3-O-sulfatiranog heparan sulfata. Navedeni oktasaharid je sintetiziran inkubacijom pročišćene 3-O-sulfotransferaze izoforme 3 i heparin deriviranog 3-OH oktasaharida.

Rezultati navedenog istraživanja sugeriraju mogućnost inhibicije infekcije herpes virusom pomoću specifičnog oligosaharida, kao terapeutskog agensa koji će blokirati ulazak virusa u stanicu domaćina. Pokazano je da infekcija virusom može biti blokirana saturiranjem glikoproteina gD virusne ovojnice malom molekulom definirane strukture. Iako potencijal ovog inhibitornog efekta nije vrlo visok, spoj pokazuje strukturnu selektivnost, što otvara prostor za dizajn oligosaharida specifičnih obrazaca sulfatacije kako bi se postigla jača inhibicija infekcije.

Afinitet vezanja oligosaharida je moguće poboljšati opsežnim studijama odnosa strukture i aktivnosti. Na primjer, afinitet vezanja oligosaharida prema gD može bit veći povećanjem veličine oligosaharida na 10 ili 12 monosaharidnih jedinica.

Kontinuirani napori sinteze oligosaharida sa različitim obrascima sulfatacije također mogu dovesti do dodatne nove molekule koja će visokom potentnošću inhibirati infekciju herpes simpleks virusa tipa 1. (Copeland i sur., 2008)

4.4 Glikanski mimetici u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima

Ugljikohidrat vežući proteini su klasificirani u lektine i sulfatirane glikozaminoglikan (SGAG) vežuće proteine. Postoje dvije kategorije lektina prisutnih u kralježnjacima: skupina intracelularnih lektina (npr., calneksin, L-tip i P-tip lektina) koji vežu jezgrene oligosaharidne strukture i uključeni su u procesiranje i kontrolu kvalitete glikoproteina, te skupina ekstracelularnih lektina (npr. galektini, C-tip, R-tip i I-tip lektina) koji prepoznaju terminalne ugljikohidratne epitope drugih stanica i patogena. Ekstracelularni lektini čine najveći broj molekularnih meta istraživanih u razvoju lijekova. (Ernst, Magnani., 2009)

U nastavku će biti govora o lijekovima kandidatima koji učinak postižu vezanjem na različite tipove lektina.

4.4.1 C-tip lektina

Glavna oznaka C-tipa lektina je uključenost iona kalcija u vezanje glikana na odgovarajuću ugljikohidrat prepoznajuću domenu (CRD). Navedeni lektini imaju širok raspon bioloških funkcija, kao što su međustanična adhezija, uklanjanje serumskih glikoproteina i prepoznavanje patogena. Selektini su najintenzivnije proučavani ugljikohidrat vežući proteini sisavaca. Otkriveni su 1989. god. te je do danas njihova funkcija adhezijskih molekula prilično jasna. Razlikujemo 3 skupine selektina: E-selektini, P-selektini i L-selektini. Sastavljeni su od kalcij ovisne ugljikohidrat vežuće domene, domene epidermalnog faktora rasta (EGF), različitih kratkih, komplementu sličnih ponavljanja, jedne transmembranske domene i unutarstaničnog repa. Iako se ugljikohidrati vežu na receptorsko mjesto unutar CRD domene, blizina EGF domene uvelike utječe na afinitet i specifičnost vezanja.

Zamijećena je različita eksprimiranost navedenih skupina selektina, ovisno o vremenu i lokaciji. (Ernst, Magnani., 2009)

Sve tri vrste selektina vežu sialyl Lewis x (sLe^x) i sialyl Lewis a (sLe^a) ugljikohidratne strukture. Zanimljivo, obje ugljikohidratne sekvence su otkrivene kao antigeni vezani uz tumor.

Navedene ugljikohidratne sekvence se nalaze na površini tumorskih stanica, te su takve stanice prepoznate kao migrirajući leukociti, što im omogućuje prolaz kroz krvotok i metastaziranje u druge organe i tkiva.

Za funkcionalno vezanje sLe^a i sLe^x in vivo, P i L selektini zahtijevaju dodatne interakcije sa negativno nabijenim sulfatnim grupama, bilo na samom ugljikohidratnom lancu ili na susjednoj peptidnoj sekvenci, što kod E selektina nije uvjet. Uključenost negativno nabijenih grupa, kao što su sulfatne i karboksilatne, kod vezanja L i P selektina je dovela do većih zamki u dizajniranju malih molekula, inhibitora selektina. Pronađen je širok spektar strukturno različitih, negativno nabijenih molekula koje vežu P i L selektine, uključujući sulfatide, heparine, fukoidane, sulfatirane dekstrane, dermatan sulfate, tirozin sulfate, sulfatiranu hijaluronsku kiselinu i sulfogalabiozu. Navedeni spektar molekula sugerira nespecifične ionske interakcije kao osnovu inhibitornog efekta tih molekula. Tako da je potrebno pažljivo procijeniti specifičnost vezanja malih molekula, visoko nabijenih antagonista P i L selektina. (Ernst, Magnani., 2009)

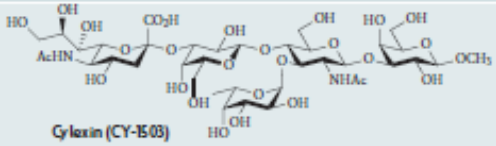
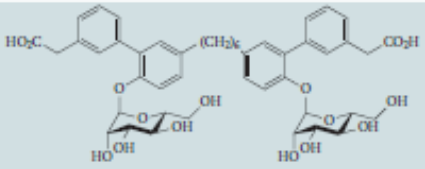
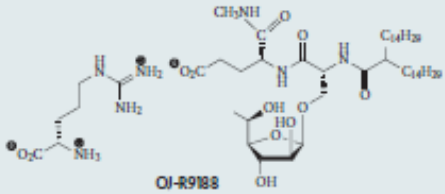
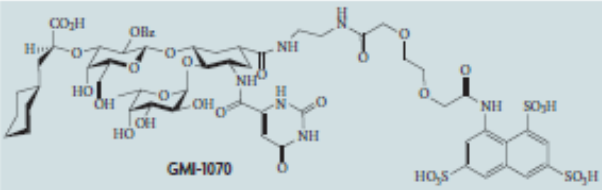
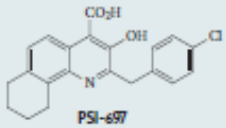
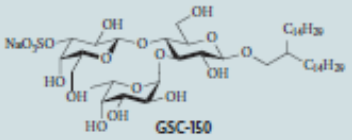
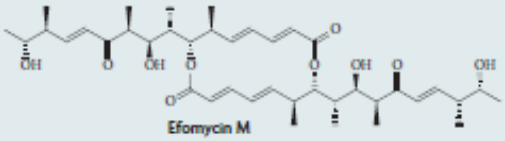
Selektini predstavljaju vrlo atraktivne mete terapeutika u bolestima gdje je u patologiji implicirana adhezija stanica, ekstraverzacija stanica iz krvotoka ili migracija specifičnih limfocita. Npr. E i P selektini posreduju akutnu adheziju i agregaciju leukocita i eritrocita tijekom vazo-okluzivnih kriza u mišjem modelu srpaste anemiije. Također, nenormalna ekstraverzacija stanica iz krvotoka je oznaka mnogih upalnih bolesti (kao što su astma, kolitis, artritis i psorijaza) i tumora. Tumorske stanice koje izlaze iz krvotoka koriste selektine kako bi metastazirale. Mnogi tumori (gastrointestinalni karcinomi, karcinomi pankreasa, pluća, prostate...) na površini stanica u velikoj mjeri ekspiriraju sLe^x i sLe^a. Ekspresija ovih selektin vežućih liganada značajno korelira sa povećanim stupnjem smrtnosti kod pacijenata sa karcinomom želuca i kolona. Cimetidin, antagonist histaminskih receptora koji suprimira vaskularnu ekspresiju E selektina, primjetno povećava stopu preživljavanja kod visoko rizičnih pacijenata sa eksprimiranim sLe^x i sLe^a na površini tumorskih stanica. Navedena činjenica potkrjepljuje korisnost selektina kao meta terapeutika u liječenju karcinoma.

Selektini i odgovarajući ligandi također imaju ključnu ulogu u širenju hematoloških karcinoma i u povratku leukemičnih matičnih stanica u mikrodomene unutar koštane srži. E-selektin je konstitutivno eksprimiran u koštanoj srži te veže ugljikohidratne ligande pronađene na leukemičnim matičnim stanicama.

Kada jednom adheriraju na mikrodomene u koštanoj srži, leukemične matične stanice postaju mirne i manje podložne djelovanju anti- proliferativnih kemoterapeutika. Otvaraju se nove mogućnosti liječenja hematoloških karcinoma potentnim antagonistima selektina. Preveniranjem dolaska leukemijom zahvaćenih stanica u koštanu srž i zadržavajući ih u cirkulaciji, kombinirana terapija, koja uključuje antagoniste selektina, bi uvellike mogla povećati osjetljivost oboljelih stanica na kemoterapeutike.(Ernst, Magnani., 2009)

Unatoč prvotnom uzbuđenju u dizajniranju malih molekula glikana, inhibitora selektina, mnoga klinička ispitivanja su zaustavljena (npr. za lijek Cylexin kojemu je primjena trebala biti u liječenju kardio-vaskularnih ozljeda). No ipak fukozilirani mimici Lewisove strukture pružaju obećavajuće rezultate u trenutnim kliničkim ispitivanjima za liječenje astme i srpaste anemije. (Ernst, Magnani., 2009)

Primjeri glikomimetika, malih molekula antagonista selektina (u različitim fazama pretkliničkih i kliničkih ispitivanja), su prezentirani u tablici .(Slika 4) C-tipu lektina također pripada DC-SIGN koji je zbog svoje uloge u širenju mnogih patogena popularna meta za dizajn novih molekula, no o njemu će biti govora kasnije.

Name and structure	Specificity	Disease	Institution	Status
 Cylexin (CY-1503)	E-, P- and L-selectin	Cardio-vascular injury	Cytel	Stopped
 Bimosiamose (TBC-1269)	E-, P- and L-selectin	Asthma and psoriasis	Revotar	Phase IIa
 OI-R9188	E-, P- and L-selectin	Allergic dermatitis	Nippon Organon	Preclinical
 GMI-1070	E-, P- and L-selectin	Sickle cell crisis	Glyco-Mimetics	Phase I
 PSI-697	P-selectin	Athero-thrombotic and venous thrombotic diseases	Wyeth	Phase I
 GSC-150	E-, P- and L-selectin	Metastatic cancer	Kanebo	Unknown
 Efomycin M	E- and P-selectin	Psoriasis	Bayer	Preclinical

Slika 4. Male molekule, antagonisti selektina u kliničkim i pretkliničkim ispitivanjima (Ernst, Magnani; From carbohydrate leads to glycomimetic drugs, Table 1)

4.4.2 I-tip lektina

Lektini I tipa su proteini koji vežu ugljikohidrate, spadaju u superporodicu imunoglobulina te uključuju Siglecs receptore (imunoglobulinu slični proteini koji vežu sijalinsku kiselinu). Siglecs su skupina površinskih receptora različito eksprimiranih u hematopoetskim stanicama koji predstavljaju vrlo obećavajuće mete u dostavi lijekova i terapiji karcinoma.

Funkcioniraju kao koreceptori stanične signalizacije i primarno su eksprimirani na leukocitima koji posreduju prirođenu i stečenu imunost. Najopsežnije karakterizirani su Siglec 2 receptori, regulatorni proteini koji preveniraju prekomjernu aktivaciju imunog sustava i razvoj autoimunih bolesti, te MAG (Siglec 4) proteini koji blokiraju regeneraciju središnjeg živčanog sustava nakon ozljede. (Ernst, Magnani., 2009)

Za razliku od perifernog živčanog sustava, oštećenom središnjem živčanom sustavu nedostaje sposobnost regeneracije aksona. Iako je neuralni rast u principu moguć, blokiran je inhibitornim proteinima eksprimiranim na mijelinu i astrocitima regrutiranim na mjesto ozljede. Identificirana su tri glavna inhibitorna proteina: retikulon 4 (RTn4), mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG) i MAG. Navedeni proteini se vežu i aktiviraju RTn4 receptor koji je lociran na površini neurona. Aktiviranje receptora vodi ka stvaranju kompleksa sa receptorom neuralnog faktora rasta (nGFR) i aktivaciji RhoA-ROCK (Rho udružena protein kinaza) kaskade što rezultira kolapsom „growth conea“, dinamičnog proširenja na vrhovima aksona koje je podržano aktinom i raste prema sinaptičkim metama. Okidač za pokretanje inhibitorne kaskade RhoA-ROCK također može biti kompleks MAGa, gangliozida i nGFRa. (Filbin., 2003)

Iako točna biološka uloga MAG-gangliozid interakcije tek treba biti razriješena, u nekim bi sustavima inhibicija regeneracije aksona MAGom mogla biti potpuno preokrenuta liječenjem sijalidazom što pak nameće sijalizirane glikane kao glavne aksonalne ligande MAG-a. Studije povezanosti strukture i aktivnosti (SAR) otkrivaju kako terminalni tetrasaharidni epitopi gangliozida pokazuju superiornije vezanje za MAG u usporedbi sa terminalnim trisaharidnim epitopima koje pronalazimo u GD1a i GD1b gangliozidima.

Daljnja precizna ispitivanja profila strukture i aktivnosti su dovela do identifikacije antagonista MAG-a koji su u nekim slučajevima izvanredno malene molekule sa poboljšanim afinitetom. Počevši od nisko afinitetnih tetrasaharida, identificirani su MAG antagonisti niske molekularne mase sa nanomolarnim afinitetom i odličnom stabilnošću u leđnoj moždini. Visoka korelacija između stupnja rasta neuralnih izdanaka i afiniteta vezanja antagonista

potvrđuje potencijal MAG-a kao mete terapeutika i predlaže mogućnost povećanja regeneracije aksona glikanskim inhibitorima. (Ernst, Magnani., 2009)

4.4.3 Bakterijski i virusni lektini

Za kolonizaciju i posljedični razvoj infektivne bolesti, enterične, oralne i respiratorne bakterije zahtijevaju adheziju na tkivo domaćina. To im omogućuje značajno veću rezistenciju na klirens i ubijanje faktorima imunog sustava, bakteriolitičkim enzimima i antibioticima. Dodatno, takve bakterije su u većoj mjeri sposobne stjecati nutrijenate, što im povećava sposobnost preživljavanja i inficiranja domaćina. Dakle, antiadhezivni lijekovi koji preveniraju adheziju patogena na tkivo domaćina nude novu strategiju u borbi protiv infektivnih bolesti. (Ofek i sur., 2003)

Alarmantno povećanje bakterijskih patogena otpornih na lijekove čini potragu za novim pristupom borbe protiv bakterijskih infekcija neophodnom. Kako antiadhezivni agensi nisu baktericidni, manja je vjerojatnost širenja rezistentnih sojeva, za razliku od baktericidnih agensa poput antibiotika. Ugljikohidratni epitopi na površini stanica domaćina, koje bakterije i virusi koriste za kolonizaciju i infekciju, su početna točka potrage za glikomimeticima, inhibitorima kolonizacije. No, antiadhezivna terapija se susreće sa brojnim izazovima. Naime, većina patogena posjeduje gene koji kodiraju različite tipove adhezina (proteini koje proizvodi većina bakterija kako bi efektivno adherirale na površinu stanica domaćina), tako da, tijekom infektivnog procesa, može biti eksprimarno više od jednog tipa adhezina. (Ernst, Magnani., 2009)

Poželjno je dizajnirati glikomimetičke antagoniste koji su u mogućnosti inhibirati više adhezina, takvi primjeri su niže navedeni za bakteriju Pseudomonas aeruginosa.

PA-IL i PA-IIL –virulentni faktori P. Aeruginosa

P. aeruginosa može biti dio normalne flore u zdravim, odraslim pojedincima, no postaje smrtonosan patogen kod imunokomprimitiranih pacijenata sa cističnom fibrozom i hospitaliziranih, kritično bolesnih pacijenata. Nažalost, postotak antibiotik rezistentnih infekcija P. Aeruginosom je u stalnom porastu.

Patogeni, za adheziju na stanice domaćina, eksprimiraju lektine kao što su PA-IL i PA-IIL. Navedeni lektini su virulentni faktori pod kontrolom „quorum sensinga“ i citotoksični su za primarne epitelne stanice u kulturi. (Bajolet-Laudinat i sur., 1994.)

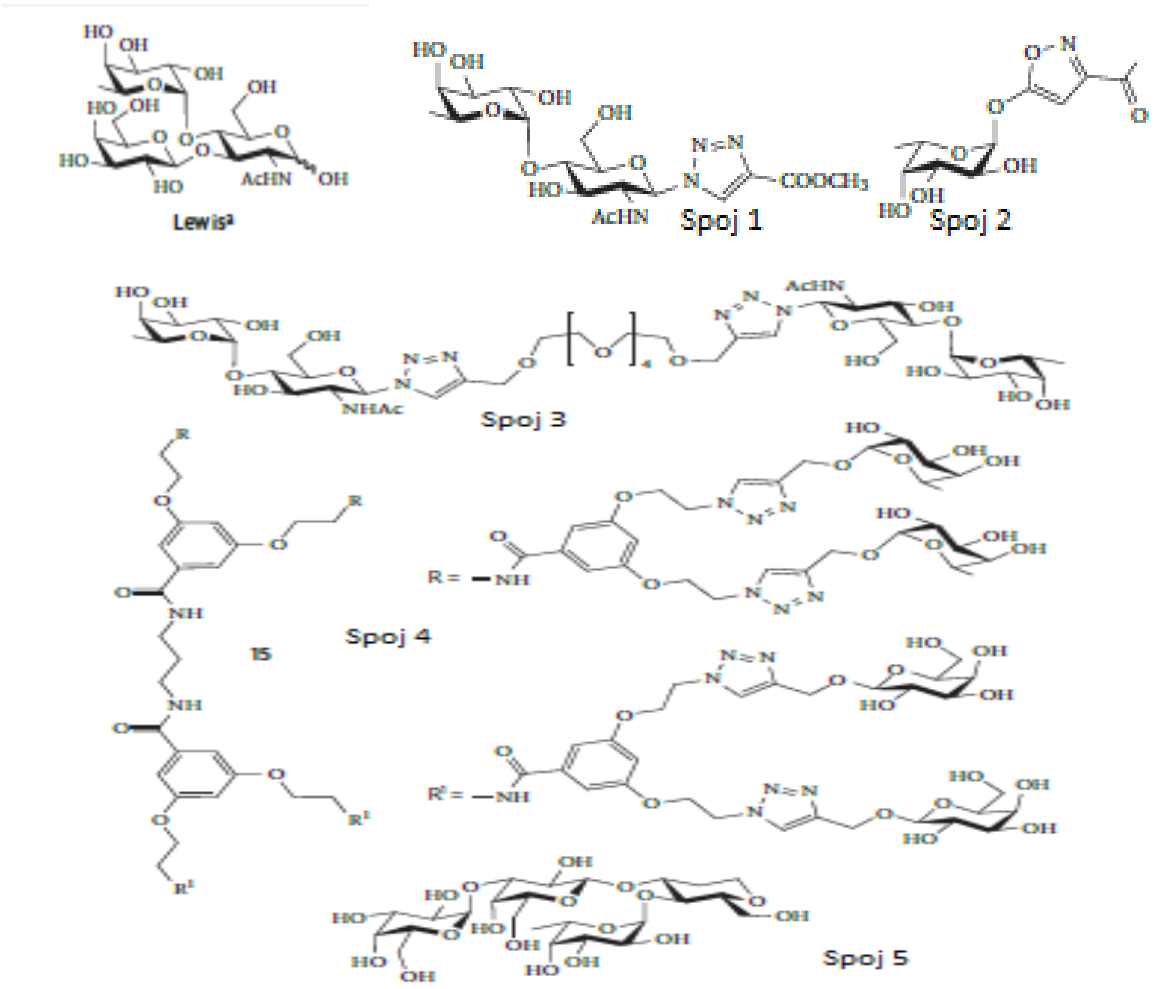
Kod niskih koncentracija inhibiraju cilijarno udaranje epitelnih stanica u uzgojenim kulturama stanica uzetih iz nazalnih polipa. 24 sata nakon dodatka fukoze cilijarno udaranje se vraća na normalnu frekvenciju. (Adam i sur., 1997.)

PA-IL i PA-IIL su tetramerni lektini koji zahtijevaju ione kalcija za vezanje ugljikohidrata. Definirana je kristalna struktura kompleksa navedenih lektina i njihovih ugljikohidratnih liganada. PA-IL preferirano veže terminalnu α vezanu D-galaktozu u prisutnosti jednog kalcijevog iona, dok PA-IIL veže neobičnim, vrlo snažnim mikromolarnim afinitetom L-fukozu te zahtjeva dva iona kalcija. PA-IL i PA-IIL su topljivi intracelularni lektini. Međutim, jednom otpušteni iz stanica uzrokuju adheriranje bakterije na tkivo domaćina. Prirodni ugljikohidratni inhibitori adherencije PA-IL i PA-IIL, D-galaktoza i L-fukoza, su uspješno iskorišteni za liječenje tobramicin rezistentne P.aeruginosa infekcije. Kombinirana terapija tobramicina sa D-galaktozom i L-fukozom (za inhibiciju virulentnih faktora PA-IL i PA-IIL) izliječila je 18 mjesečno dijete sa sistemskom i pulmonalnom infekcijom. (Ernst, Magnani., 2009)

Pretraživanjem glikana otkrivena je struktura Lewisovog^{a}trisaharida (Galβ(1-3)[Fucα(1-4)]Glc*N*Ac) (slika 5) kao visoko afinitetnog liganda za PA-IIL. Kako bi se smanjila kompleksnost trisaharidnih antagonista, sintetizirani su disaharidni glikomimetici bazirani na Fucα(1-4)GlcNAc, npr. sintetiziran je spoj antagonist 1 (Slika 5).
Daljnja pojednostavljenja PA-IIL antagonista su postignuta sintezom spojeva koji su α-fukozidazom vezali heterociklički supstituent, aglikon. Začuđujuće, neki spojevi kandidati, npr. spoj 2(slika 5.), imaju sličan potencijal i afinitet kao Lewis^{a}trisaharid. Oligovalentne forme Fucα(1-4)GlcNAc epitopa, kao što je spoj 3 (slika 5), pokazuju povećanu aktivnost u usporedbi sa monovalentnim formama.

U konačnici, u prevenciji adhezije P. aeruginose posredovane istovremeno lektinima PA-IL i PA-IIL, konstruirani su bifukcionalni ligandi koji sadrže D-galaktozu i L-fukozu u oligovalentnom nizu (kao spoj 4) ili male molekule glikomimetika (kao spoj 5).(Ernst, Magnani., 2009)

U studiji koja određuje efikasnost spoja 5, kod miševa izloženih 30 postotnoj kirurškoj hepatektomiji, 60% miševa iz kontrolne grupe je uginulo 48 sati nakon akutne infekcije P.aeruginosom, dok su svi miševi liječeni sa spojem 5 preživjeli infekciju. (Magnani i sur.,2012)



Slika 5.Spojevi inhibitori PA-IL i PA-IIL; (Ernst, Magnani; From carbohydrate leads to glycomimetic drugs, Figure 4)

FimH lektini uropatogene E. Coli

Infekcije urinarnog trakta su među najraširenijima inflamatornim bolestima uzrokovanim patogenima. Dominantan patogen u infekcijama urinarnog trakta je uropatogena Escherichia coli (UPEC) koja uzrokuje više od 80% svih infekcija kod inače zdravih ljudi (nekomplicirane infekcije urinarnog trakta). Kod zdravih pojedinaca većina uropatogena potječu iz rektalne mikroflore i ulaze u inače sterilan mjehur kroz uretru, gdje pokreću infekciju (cistitis). (Fihn i sur., 2003)

Kada se jednom nađe u urinarnom traktu bakterija prijanja na epitel urinarnog trakta preko adhezijskih fimbrija te tako izbjegava obrambeni mehanizam domaćina. Tako vezana, bakterija je vjerojatno internalizirana u aktivnom procesu sličnom fagocitozi. (Palmer i sur., 1997)

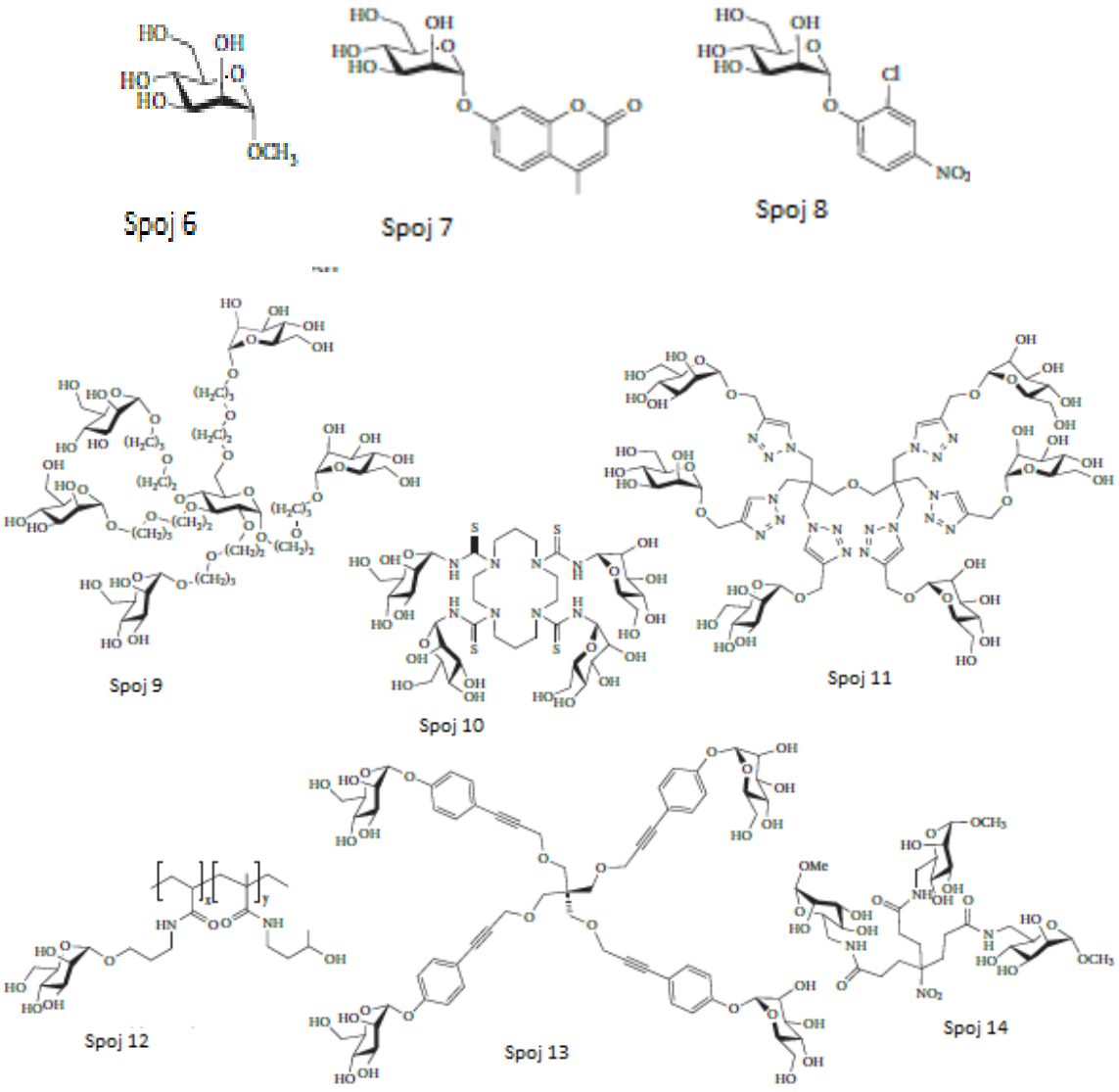
Nekomplicirane infekcije urinarnog trakta mogu biti učinkovito liječene oralnim antibioticima kao što su florokinoloni, kotrimoksazol ili amoksicilin i klavulonat, ovisno o osjetljivosti uključenog patogena. Međutim, rekurentne infekcije i svaka sljedeća izloženost antibioticima može rezultirati antimikrobnom rezistencijom koja često vodi do neuspješnog liječenja i smanjuje opseg terapeutskih opcija. Tako da postoji hitna potreba za učinkovitom i sigurnom neantibiotskom terapijom kako bi se prevenirale i liječile infekcije urinarnog trakta bez mogućnosti nastanka antimikrobne rezistencije. Inhibicija tipa 1, fimbrijama posredovanog prijanjanja bakterija na epitel mjehura, je obećavajući pristup u postizanju ovog cilja. Studije su pokazale da je α-manozid primarni ligand stanica mjehura za uropatogenu E.coli te da prijanjanje zahtjeva visoko konzervirane lektine FimH koji su locirani na vršcima bakterijskih fimbrija. Prije više od dva desetljeća identificirani su različiti oligomanozidi i aromatski α-manozidi koji antagoniziraju tip 1, fimbrijama posredovane bakterijske adhezije.(Ernst, Magnani., 2009)

Kristalna struktura FimH receptor vežuće domene razriješena je 1999.god., dok je struktura odgovarajućeg kompleksa sa oligomanozidom-3 od nedavno postala dostupna. Unatoč detaljnom znanju o vezanju FimH i manozida, učinjeno je vrlo malo pokušaja translacije informacija u antagoniste niskih molekularnih masa. Nekolicina monovalentnih antagonista FimH su prikazani na slici 6. Referentni spoj, metil α-D-manozid (spoj 6, slika 6), se veže u milimolarnom rasponu afiniteta, dok se najpotentniji monovalentni antagonist veže sa nanomolarnim afinitetom. Afiniteti vezanja se mogu objasniti na temelju strukture ugljikohidrat prepoznajuće domene koja je locirana na vrhovima FimH proteina.

Povećanje afiniteta je postignuto korištenjem oligovalentnih i multivalentnih FimH antagonista (npr. spojevi od 9-14).

Primjena alosteričkih antagonista koji su sposobni stabilizirati nisko afinitetnu konformaciju, umjesto primjene kompetitivnih antagonista, moglo bi dovesti do vrlo uspješne terapije.

Iako su pronađeni monovalentni i oligovalentni antagonisti sa nanomolarnim afinitetima, ne postoje podaci koji se odnose na njihova farmakokinetička svojstva. Međutim, za liječenje infekcija urinarnog trakta, oralna bioraspoloživost i brza renalna sekrecija (kako bi se došlo do mete u urinarnom traktu) preduvjeti su terapeutskog uspjeha. (Ernst, Magnani., 2009)



Slika 6, Fim H antagonisti, (Ernst, Magnani; From carbohydrate leads to glycomimetic drugs,Figure 5)

4.5 Povijest i budući potencijal polivalentnih glikanskih mimetika

Glavno ograničenje malih molekula, monovalentnih glikanskih struktura, su često preslabe interakcije vezanja lektina te je njihova upotrebljivost kao prikladnih lijekova kandidata upitna. Uzevši to u obzir, uspješno su razvijeni multivalentni glikokonjugati koji imaju prednosti tzv. „klaster glikozidnog efekta“ kako bi se poboljšao afinitet vezanja lektina. (Becer, 2012)

Ovaj pristup je rezultirao sa tri glavna tipa glikoziliranih makromolekularnih struktura: glikonanočesticama, glikopolimerima i glikodendrimerima. Iako je većina ovih materijala, u okvirima biološke primjene, još uvijek u začetku, oni predstavljaju novi val glikan utemeljene tehnologije. (Hudak, Bertozzi, 2014)

4.5.1 STARFISH

Klinički, u najvećoj mjeri obečavajući za upotrebu su nedvojbeno glikodendrimeri. Dendrimeri su globularne strukture koje sadrže centralnu jezgru, slojeve grananja te brojne funkcionalne krajnje skupine. Iako se glikodendrimeri sintetiziraju već desetljećima, jedan od prvih terapeutski relevantnih uspjeha bio je dizajn STARFISHA-a; oligovalentnog, dendronu sličnog spoja, sa velikim potencijalom u inhibiciji Shiga-like toksina.(Hudak, Bertozzi, 2014)

Bolesti uzrokovane Shiga i cholera toksinima broje više od milijun smrti godišnje. Navedeni toksini spadaju u klinički značajan podskup bakterijskih AB5 toksina koji se sastoje od enzimatski aktivne podjedinice A koja omogućava ulazak u osjetljive stanice sisavaca, nakon prepoznavanja oligosaharidnog B5 homopentamera.

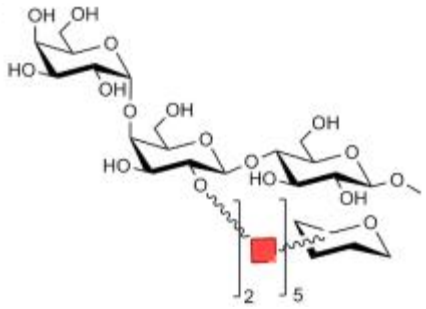
Donesen je zaključak kako bi terapija mogla biti usmjerena na obavezan događaj prepoznavanja oligosaharida i toksina, no nizak afinitet interakcije ugljikohidrata i proteina je kočio razvoj inhibitora niske molekularne mase. Afinitet vezanja toksina je mnogo veći zbog simultanog vezanja toksina na 5 ili više ugljikohidratnih skupina stanične površine.

Dizajniran je oligovalentni, u vodi topljiv ugljikohidratni ligand, subnanomolarne inhibitorne aktivnosti; STARFISH.
Spoj sadrži analog Gb3 trisaharida (Pk) dodan glukoznoj pentavalentnoj jezgri. (slika 7)
Gb3 je poznat ligand za multimerne „Shiga-slične toksine I i II“ pronađene u patogenoj E.coli.

Multivalentni izložak Pk u STARFISH-u prikazuje in vitro 1-10 milijuna puta veću inhibitornu aktivnost prema Shiga sličnom toksinu nego bilo koji drugi poznati univalentni ligand te do sada najveću molarnu aktivnost u odnosu na ostale pronađene inhibitore Shiga-like toksina I i II. (Kitov i sur., 2000)

Slični pristupi su iskorišteni kako bi se vezao i neutralizirao kolera toksin te na temperaturu osjetljiv enterotoksin. Dendrimeri sa pentasaharidom koji sadrži sijalinsku kiselinu, GM1, in vitro vežu toksine te inhibiraju celularnu toksičnost. (Purkin i sur.,2007)

Bundle i suradnici su unaprijedili prethodni STARFISH inhibitor stvarajući glikopolimere građene od monomera koji su sadržavali Pk glikan povezan na ciklički piruvat ketal nazvan (S)-PoliBAIT. (Kitov i sur,2008)



Slika 7, STARFISH, inhibitor Shiga-like toksina(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111574/figure/F3/)

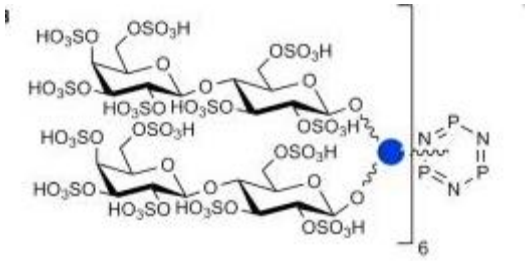
4.5.2 Dendrimerni glikopolimer etilen oksida

Dendrimerne strukture se također učinkovito koriste kako bi se blokirali ili pobliže proučili ugljikohidrat vežući proteini. (Hudak, Bertozzi., 2014) Definiran, razgranat polimer etilen oksida (PEO), prilagođenog oblika, veličine i geometrije predstavlja koristan model blokade selektina što zahvaljuje definiranoj molekularnoj arhitekturi, hidrofilnosti i dostupnosti višestrukih reaktivnih mjesta. Nadalje, razgranata polimerna struktura također osigurava mehanizme kontrole pristupačnosti, mobilnosti, gustoće i supramolekularne organizacije pridodanih šećernih epitopa koji olakšavaju dizajn optimalnih selektin vežućih antagonista sa definiranim vremenom poluživota. Sintetizirana je prva i druga generacija dendrimernih PEO glikopolimera, s visoko sulfatiranom β laktozom, u vidu potencijalnih inhibitora L-selektina. (Rele i sur., 2005)

Chaikof i suradnici su prikazali kako visoko valentan PEO zvjezdani dendrimer s visoko sulfatiranim laktoznim ligandima može s visokim afinitetom vezati selektine i smanjiti upalu, kada se primjenjuje na mišje modele.(Rele i sur., 2005)

Davisova istraživačka grupa je konjugiranjem sLe^x glikonanočesticama također stvorila multimerni ligand selektina koji sadrži funkcionalni željezov oksid.

Kako je željezov oksid dozvoljeno MRI kontrastno sredstvo, sposobnost nanočestica da ciljaju selektine je omogućilo uspješan in vivo imaging cerebralne upale kod animalnih modela multiple skleroze i infarkta miokarda. (van Kasteren i sur.,2009)



Slika 8, PEO zvjezdani dendrimer sulfatirane laktoze,
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111574/figure/F3/)

4.5.3 Multivalentni glikomimetici, inhibitori DC-SIGNa

Mukozne površine predstavljaju okolišnu barijeru koja je potencijalno osjetljiva na infekciju. Migrirajuće dendritične stanice čuvaju mukoznu površinu zarobljujući mikroorganizme i prezentirajući procesirane antigene aktiviranim T stanicama, time inducirajući imuni odgovor protiv okupatorskih patogena. Pretraživanjem knjižnica dendritičkih stanično specifičnih monoklonskih protutijela koja inhibiraju vezanje međustanične adhezijske molekule 3 (ICAM3; adhezijska molekula koja aktivira T stanice) pronađen je površinski protein: DC-SIGN. (Geijtenbeek i sur., 2000)

DC-SIGN eksprimiran na patrolirajućim dendritičkim stanicama u mukozi veže ugljikohidratne strukture na gp120 proteinu ovojnice HIV-a, što predstavlja početak ulaska virusa u stanice domaćina. Čestice HIV-a vezane na DC-SIGN na površini dendritičkih stanica zaštićene su od razaranja u krvotoku.

DC-SIGN se specifično veže za fukozne i manozne ostatke, sa većim afinitetom i specifičnošću prema fukozi u Le^a i Le^x tipu oligosaharidne strukture.

Osim virusa HIV-a, raznovrsni drugi patogeni, kao što su hepatitis C virus, ebola virus, coronavirusi (koji izazivaju ozbiljne akutne respiratorne sindrome), citomegalovirusi kao i bakterije Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori te kvasci (Candida albicans) iskorištavaju DC-SIGN kako bi inficirali domaćina.

Nedavno je pokazano da čak i paraziti, kao što su Leishmania spp. i Shistosoma mansoni također vežu DC-SIGN. (Ernst, Magnani., 2009.)

Činjenica da se različiti patogeni služe DC-SIGNom učinila je taj protein zanimljivom metom terapeutskih intervencija. Studija koja se bavila vezanjem i transferom virusa HIV-a u stanice humane rektalne mukoze pokazala je kako je više od 90% vezanog virusa, vezano na stanice koje eksprimiraju DC-SIGN, iako te stanice čine samo 1-5% od svih mukoznih mononuklearnih stanica. Osim toga, DC-SIGN specifična antitijela blokiraju više od 90% HIV vezanja. (Gurney i sur., 2005)

Druge studije su pokazale sposobnost multivalentnih glikokonjugata $Lewis^x$ strukture ili D-manoze da preveniraju vezanje Ebole ili herpes virusa na dendritičke stanice preko DC-SIGNa, te posljedičnu infekciju stanica. (Lasala i sur.,2003 ; Rappacciolo i sur., 2006)

Glikomimetički spojevi koji inhibiraju DC-SIGN bazirani su na dvije vodeće strukture: prva je visoko manozni oligosaharid, dok je druga L-fukoza kao dio Lewisovog epitopa. Kako bi se unaprijedio afinitet i farmakokinetčka svojstva prirodnih antagonista, sintetizirani su glikomimetici oba tipa (manozni tip i L-fukozni tip).

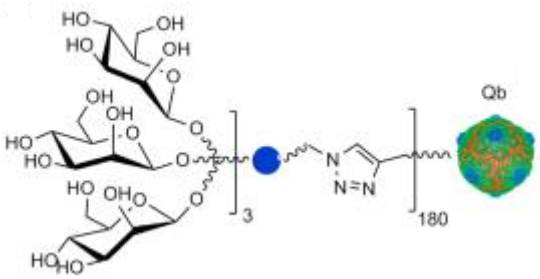
Nizovi velike gustoće nerazgranatih Manα(1-2)Man terminiranih oligosaharida vežu DC-SIGN gotovo jednako učinkovito kao cjelokupan oligosaharid manoze.

Dakle, pretpostavlja se da nereducirajući krajevi, fragmenti Manα(1-2)Man oligosaharida Man_9 igraju odlučujuću ulogu u prepoznavanju DC-SIGNa. (Ernst, Magnani.,2009)

2008. god., Wang i suradnici su razvili oligomanozni dendron koji je u nanomolarnom opsegu spriječio vezanje manoziliranih proteina ovojnice, gp120 na rekombinantni dimerni DC-SIGN protein. (Wang i sur.,2008) Od tada su i druge skupine znanstvenika pokazale da mogu inhibirati trans-infekciju HIVom, blokiranjem virusa nanočesticama koje sadrže manozne dendrimere. Također je dokazano da visoko manozni dendrimer može uspješno inhibirati DC-SIGN posredovanu infekciju HIV-om u staničnom i humanom uterinom cerviks eksplant modelu. (Hudak, Bertozzi., 2014)

Davisova istraživačka grupa je razvila metodologiju u kojoj su glikodendrimeri pripojeni na različita mjesta proteina te stvaraju visoko valentne „glikodendriproteine“.

Ova tehnologija je upotrjebljena u konjugaciji manoznih dendrimera na Qβ samoorganizirajuće proteine, ikosahedrone.(Slika 9) Rezultirajuće „glikodendronanočestice“ su najviše valentni glikodendrimerni konstrukti sa promjerom do 32 nm, što odgovara 1620 glikanskih jedinica. Upotrebljavajući ove supervalentne konstrukte bilo je moguće inhibirati infekciju dendritičkih stanica Ebolom, blokirajući virusno vezanje na DC-SIGN. (Ribeiro-Vianna i sur., 2012)



Slika 9,Qβ glikodendronska čestica koja inhibira DC-SIGN ovisnu infekciju Ebolom (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111574/figure/F3/)

4.6 Cjepiva bazirana na ugljikohidratima

Mnoga trenutno korištena cjepiva sastoje se od glikana, uključujući cjepiva protiv Neisserie meningitidies, Streptococcus pneumonie, Haemophilus influenzae tip b i Salmonelle typhi. (Seeberger, Werz., 2007) Međutim, navedeni su konstrukti derivirani iz prirodnih izvora i koriste nespecifične konjugacijske metode vezanja na proteine nosače. U nastavku će fokus u većoj mjeri biti na trenutni razvoj u korištenju sintetskih glikoinženjerstvom dobivenih cjepiva, kako bi se kreirali definiraniji terapeutici.

Napredci na području konjugacije proteina su također proširili dostupne tehnike za sintezu ugljikohidratnih cjepiva pridodanih proteinskim nosačima.(Hudak, Bertozzi., 2014)

4.6.1 Ugljikohidratne podjedinice kao kandidati za cjepiva

Ugljikohidrati epitopi ili glikotopi su strukturno različiti, dolaze u različitim kontekstima te su prisutni na površini stanica u tijelu i na površini patogena. Različite strukturne varijacije i načini prezentacije utječu na način na koji ih tijelo percipira i procesira te diktiraju rezultat imunog odgovora usmjerenog protiv njih.

Poznato je da baktericidna i/ili opsonična antitijela, usmjerena na glikotope kapsularnih polisaharida, štite od invazivnih bolesti uzrokovanih kapsularnim bakterijama te je sukladno tomu razvoj cjepiva fokusiran na dobivanje specifičnih protutijela.(Lucas i sur., 2005)

Pročišćena polisaharidna cjepiva se koriste više od 40 godina, no dokazana je njihova varijabilna imunogenost i varijabilna učinkovitost u zaštiti osjetljivih populacija protiv invazivnih meningokoknih i pneumokoknih bolesti te bolesti uzrokovanih virusom gripe (Haemophilus influenze tip b). (Lucas i sur., 2005)

Ukoliko se primjenjuju kao pročišćena polisaharidna, učinkovitost cjepiva je generalno limitirana skromnom prirodom imunog odgovora, manjkom memorije i nemogućnošću stimulacije odgovora kod male djece koja su najpodložnija ozbiljnim infekcijama uzrokovanim kapsuliranim mikroorganizmima. Demonstracija da dojenčad mogu proizvesti preotektivna antikapsularna protutijela nakon imunizacije Hib (Haemophilus influenze tip b) polisaharidnim protein konjugatom, predstavlja velik napredak u javnom zdravlju te temelj za razvitak novih cjepiva konjugata. (Robbins i sur., 1996)

Učinkovito pneumokokno cjepivo, heptavalentni kapsularni polisaharidni konjugat je razvijen i odobren u SAD-u za primjenu kod djece i dojenčadi. (Black, Shinefield., 2002) Upotreba navedenog cjepiva je dovela do značajnog smanjenja ozbiljnih pneumokoknih bolesti. Cjepivo se također pokazalo uspješnim u redukciji ozbiljnih otitis media uzrokovanih bakterijom Streptoccocus pneumoniae. (Block i sur., 2004)

Studije rađene u Izraelu su pokazale da navedeno cjepivo može povoljno utjecati na smanjenje antibiotik rezistentnih sojeva u procijepljenoj populaciji. Međutim, rastući dokazi demonstriraju kako bi zamjena serotipova sa kapsularnim tipovima na koje cjepiva ne djeluju mogao biti budući problem koji zahtijeva promjene u spektru vakcinacije.(Lucas i sur., 2005)

Meningokokni polisaharid serogrupe A je vrlo neobičan jer je imunogeničan kod dojenčadi od 3 mjeseca starosti, te se primjenom ponovljenih doza izaziva pojačani odgovor antitijela. Reimunizacija u 2. i 6. godini održava visok stupanj zaštite.

Vakcinacija protiv meningokoka serogrupe A je vrlo učinkovita u prevenciji bolesti u brojnim državama (Kina, Finska, Afričke države...). Međutim, pokušaji pripreme proteinskog konjugata grupe A meningokoknog kapsularnog polisaharida nisu pokazali povećanu imunogeničnost.

Meningokoki grupe B su glavni uzrok ozbiljnih meningokoknih bolesti u SAD-u. Kapsularni polisaharid grupe B je neimunogeničan.

Potencijal induciranja autoimunosti i manjak imunogeničnosti je obeshrabrio komercijalni razvoj cjepiva baziranih na polisaharidima.

Meningokokno konjugatno cjepivo polisaharida grupe C se pokazalo kao odlično cjepivo. U Ujedinjenom Kraljevstvu je zabilježen pad stope bolesti izazivanih meningokokom grupe C nakon vakcinacije navedenim konjugatom.

Naknadne studije su pokazale da nema dokaza za cjepivom uzrokovane promjene meningokoknih kapsularnih serogrupa iz serogrupe C u druge serogrupe.(Lucas i sur., 2005)

Alternativni pristupi su fokusirani na druge antigene kao što su vezikule vanjske membrane. Cjepivo vezikula vanjske membrane (OMV) ima dobru učinkovitost kod starije djece i odraslih. (Tappero i sur.,1994) Znanstvenici na sveučilištu Oxford i Wyeth proučavaju detoksificiran meningokokni lipopolisaharid kao konjugatno cjepivo. Unutarnja jezgra meningokoknog lipopolisaharida je relativno dobro konzervirana te korištenje prikladnih konjugacijskih procesa može rezultirati širokom reaktivnošću meningokoknih lipopolisaharidnih cjepiva. (Lucas i sur.,2005)

4.6.2 Prvo sintetsko cjepivo

Najuspješniji slučaj korištenja sintetski definiranog cjepiva je produkcija Kubanskog Hib (Haemophilus influenzae tip b) cjepiva; prvog klinički odobrenog, u potpunosti sintetskog, ugljikohidratnog cjepiva baziranog na strukturi antigenog kapsularnog polisaharida. (Verez-Bencomo.,2004)

Hib je važan ljudski patogen sa bitno značajnijom prevelencijom u razvijenim zemljama, pogotovo do uvođenja uspješnog konjugatnog cjepiva 1990.god. Međutim, u zemljama u razvoju dolazi do 600 000 smti dojenčadi kao rezultat Hib-inducirane pneumonije ili meningitisa.(Verez-Bencomo.,2004)

Široka upotreba polisaharida kao cjepiva se pokazala kao koristan način zaštite odraslih i starije djece. Daljnji napredak u stvaranju produžene imunosti, pogotovo kod dojenčadi, je postignut kovalentnim povezivanjem polisaharida i proteina nosača. Zapravo, visok stupanj uspjeha postignut Hib glikokonjugatnim cjepivom je potaknuo sličan pristup u stvaranju cjepiva za meningokoke grupe C te Streptocococcus pneumoniae (o čemu je više govora u prethodnom tekstu). (Verez-Bencomo.,2004)

Fragment Hib kapsularnog polisaharida, korišten u nekim odobrenim cjepivima, može biti kratak svega 5 ribozilribitol-fosfat ponavljajućih jedinica. Sposobnost sintetske ugljikohidratne kemije da oponaša takve fragmente je pokazana u više laboratorija korištenjem postepene višestupanjske sinteze.

Rezultirajući sintetski antigeni su poslužili kao komponente cjepiva kandidata sa dokazanom učinkovitošću u stvaranju imunosti kod životinja. Verez-Bencomo i suradnici su razvili metodologiju kojom se pod uvjetima dobre proizvođačke prakse (GMP) proizvode antigeni slični Hib polisaharidnim fragmentima. Prethodni proces sinteze je redizajniran te uključuje sintetski put sa smanjenim brojem reakcija i koraka kromatografskog čišćenja. Također je razvijena potencijalno superiorna metoda oligomerizacije ribozilribitol-fosfat ponavljajućih jedinica u kojem saharidni fragment, koji sadrži ključni konformacijski epitop, može biti dobiven u jednom koraku.

Rezultirajuće konjugatno cjepivo koje sadrži bakterijski ugljikohidratni antigen se pokazalo kao jednako sigurno i imunogenično kod ljudi, kao i prije postojeće, odobreno cjepivo koje sadrži nativni polisaharid.(Verez-Bencomo.,2004)

Dobiveni sitetski pentasaharid, konjugiran na tetanus toksin, produciran je u dovoljno velikom obimu (u uvjetima dobre proizvođačke prakse) za inkorporaciju u Kubanski rutinski sustav vakcinacije.(Hudak, Bertozzi., 2014)

Dostupnost sintetskom, kompleksnom cjepivu baziranom na ugljikohidratima omogućuje alternativnu strategiju u borbi protiv infekcija uzrokovanih Hib-om.

Sličan pristup je korišten za dobivanje cjepiva protiv malarije.

4.6.3 Sintetski GPI kao cjepivo kandidat kod modela malarije

Parazit koji izaziva malariju, Plasmodium falciparum, godišnje inficira 5-10% svjetske populacije i ubija približno dva milijuna ljudi. Fatalni slučajevi su djelomično rezultat patoloških reakcija pokrenutih toksinom malarije. (Schofield i sur., 2002)

Glikozilfosfatidil-inozitole (GPI) pronalazimo na vanjskoj staničnoj membrani svih eukariota. Kod parazita Plasmodium falciparum sidre različite proteine na površinu stanica, no također mogu postojati bez vezanih proteina.

In vivo i in vitro studijama je utvrđeno da su GPI vjerojatni kandidati toksina kod malarije te doprinose indukciji upalnih citokina, vrućice i drugih patoloških simptoma do kojih dolazi puknućem shizonta. Iako evolucijski očuvani, čini se da postoji dovoljno strukturnih razlika koje pružaju parazitskim GPI mogućnost aktivacije drugog glasnika te izazivanja imunog odgovora u stanicama sisavaca. U populaciji izloženoj P. falciparum, odgovor protutijela na pročišćeni GPI je karakteriziran predominantnošću imunoglobulina G (IgG) pred imunoglobulinom A. (Boutlis i sur., 2005)

Kako anti-toksična cjepiva mogu biti visoko učinkovit alat javnog zdravlja, Schofield i suradnici su ispitali mogućnost korištenja anti-GPI cjepiva u prevenciji patologije i fatalnih slučajeva na modelima ozbiljne malarije (glodavci inficirani Plasmodium berghei). Kemijski je sintetizirana glikanska sekvenca glikozilfosfatidilinozitola parazita P.falciparum, konjugirana je na nosače i iskorištena za imunizaciju miša. Primatelji su bitno zaštićeni od acidoze uzrokovane malarijom, pulmonalnog edema, cerebralnog sindroma i posljedične smrtnosti. Anti-GPI protutijela neutraliziraju upalnu aktivnost P. falciparum in vitro. Prema tome, navedenom studijom je pokazano kako je GPI značajan upalni endotoksin parazitskog podrijetla te kako je više parametara bolesti u malaričnih miševa toksin ovisno. Dakle, sintetski GPI je prototip ugljikohidratnog anti-toksičnog cjepiva protiv malarije.(Schofield i sur., 2002)

Ista skupina znanstvenika je također uspješno proizvela cjepivo protiv Bacillus anthracisa, tetrasaharid spora koji je iskorišten za podizanje razine protutijela protiv antraksa u svrhu detekcije.(Tamborrini i sur., 2006)

4.6.4 Sintetsko konjugirano cjepivo protiv infekcije Shigellom flexneri 2a

Shigella, gram-negativna enteroinvazivna bakterija koja uzrokuje bacilarnu dizenteriju ili šigelozu je javno zdravstveni problem diljem svijeta. Shigella je česta u područjima s niskom razinom higijene te većinom inficira djecu ispod 5 godina starosti. S. Flexneri 2a (SF2a) član je skupine B shigella i predstavlja najraširenij soj diljem svijeta. Nadalje, u zemljama u kojima je bolest endemična, izolirano je više serotipova S.flexneri.

Serološka klasifikacija je bazirana na ponavljajućim jedinicama O-specifične polisaharidne (O-SP) podjedinice lipopolisaharida koja se ponaša kao glavni faktor virulencije Shigelle te omogućuje bakterijsku rezistenciju na mehanizme obrane domaćina.(Phalipon i sur, 2009)

Zaštita inducirana prirodnom infekcijom je smatrana serotip-specifičnom što upućuje na O-SP kao glavnu metu zaštite. Ranije je, kao posljedica fatalnog učinka na shigele, na inokulumu epitelne površine tankog crijeva, postavljena hipoteza protektivne uloge anti-O-SP serumskih IgG protutijela. (Robbins i sur.,1992)

Hipoteza je naknadno potkrijepljena kliničkim podacima i izvještajima o imunogeničnosti Shigella detoksiciranog LPS-proteinskog konjugata kod odraslih i starije djece.(Cohen i sur., 1997) Također je sugerirano da bi proizvedena protutijela mogla biti ljekovita. (Chowers i sur., 2007)

Kao što je već navedeno, zaštitni antigen Shigelle je O-specifična polisaharidna domena lipopolisaharida (LPS) koja predstavlja veću komponentu bakterijske površine.

Kao alternativa razvoju cjepiva baziranih na detoksiciranom LPS, uložen je trud u istraživanje novih glikoproteina koji obuhvaćaju sintetske oligosaharide koji oponašaju O-SP antigen. Iniciran je program kojemu je cilj razvoj treće generacije ugljikohidrat baziranih cjepiva protiv infekcije SF2a. Strategija je bazirana na upotrebi sintetskih oligosaharida koji se ponašaju kao učinkovito funkcionalni mimici O-specifičnog polisaharida Shigelle. Dakle, bitan korak detoksikacije LPS je izbjegnut. Sintezom širokog panela fragmenata O-SP i opsežnim istraživanjem njihovog prepoznavanja protektivnim monoklonskim IgG protutijelima, Bealot i suradnici su pokazali kako odabrani oligosaharid inducira anti-O-SP odgovor protutijela kada se primjenjuje kao tetanus-toksoid konjugat.

Povećanjem veličine ugljikohidratnog haptena od penta-saharida do deka- i pentadeka-saharida, što predstavlja dvije, odnosno tri biološke ponavljajuće jedinice O-SP Shigelle,

pojačava se anti-LPS odgovor IgG protutijela. Istražen je protektivni kapacitet glikokonjugat induciranih anti-LPS antitijela protiv infekcije SF2a kod miševa te je zaključeno kako pentadeka-saharid oponaša polisaharidni antigen. (Phalipon i sur, 2009)

Dakle, u navedenoj studiji je pokazano da pentasaharid inducirana anti-LPS 2a protutijela učinkovito štite miševe od infekcije Shigellom. Tj., tri ponavljajuće jedinice, koje prepoznaje imuni sustav inficiranog pacijenta, se ponašaju kao funkcionalni mimici prirodnog polisaharidnog antigena.

Analize parametara koji utječu na imunogeničnost otkrivaju kako istraživano Shigella flexneri 2a pentasaharidno cjepivo izaziva brz i konstantan odgovor anti-LPS protutijela, bez induciranja anti-linker protutijela, kada se primjenjuje 4 puta u dozi koja odgovara 1μg ugljikohidrata.

Profil odgovora anti-LPS protutijela, u kojem dominira produkcija IgG1 protutijela, oponaša odgovor zamijećen u ljudima nakon prirodne infekcije Shigellom flexneri 2a. Zaključno, gore navedeni sintetski ugljikohidratni konjugat bi mogao biti vrlo uspješan kandidat za cjepivo protiv infekcije Shigellom. (Phalipon i sur, 2009)

4.6.5 Sintetsko glikopeptidno cjepivo kao zaštita od Candide albicans

Povećana incidencija životno ugrožavajućih gljivičnih bolesti, te s time povezana visoka stopa neuspješnog liječenja, je pružila poticaj za razvoj antifungalnih cjepiva kao preventivne strategije. Dok su neka cjepiva konstruirana kako bi inducirala stanicama posredovanu imunost, druga daju prednost protektivnom odgovoru antitijela. (Xin i sur., 2008)

Proteklih godina su nađeni čvrsti dokazi obrane od kandidijaze, kriptokokoze i drugih mikoza protutijelima. Aktivna imunizacija koja promiče pozitivni humoralni imuni odgovor uključuje fungalne površinske antigene, tj. ugljikohidrate i proteine.

Fokus današnjih istraživanja je na kandidijazi koja je 4. vodeći uzrok bolničkih infekcija krvotoka, uzrokuje mukozne infekcije kod bolesnika s AIDS-om te >70% žena iskusi barem jedan nastup vulvo-vaginalne kandidijaze tijekom života.(Xin i sur., 2008)

Xin i suradnici su demonstrirali da protutijela, koja prepoznaju β-1,2-povezanu manotriozu i β-1,2-povezanu manobiozu fosfomananskog kompleksa staničnog zida Candide albicans i

nekoliko drugih vrsta kandide, štite od hematogeno rasprostranjene kandidijaze i vaginalnih infekcija kod miševa.

β-$(Man)_3$ je izabran kao ugljikohidratni epitop cjepiva, no nekonjugirani oligosaharidi su vrlo slabo imunogenični. Istraženi su peptidi fungalnog staničnog zida koji mogu poslužiti kao nosači te osigurati dodatne zaštitne epitope.

Takva cjepiva bi mogla inducirati zaštitu od sojeva koji ne produciraju ugljikohidratni epitop, pogotovo jer navedena podjedinica nije neophodna za rast C.albicans te približno samo 80 % izolata C.glabrate, drugog bitnog uzročnika kandidijaze, producira β- povezane manozide. Kako bi se zadovoljile navedene značajke, razvijena je visoko učinkovita kemija konjugacije koja je omogućila konjugaciju β-$(Man)_3$ sa 6 peptidnih nosača deriviranih iz staničnog zida Candide albicans. (Xin i sur., 2008)

Lipinski i suradnici su također proučavali imunogeničnost glikopolimernih konjugata. Koristeći nove metode kojnugacije dobili su strukture multivalentnih epitopa. Sintetizirali su protektivni β-manan trisaharidni epitop te ga aktivirali kopolimerizacijom sa akrilamidom. Rezultirajući glikopolimer sadrži 33 trisaharidna haptena te je derivatiziran za konjugaciju na imunogene proteine nosače, pileći serumski albumin.

Mišji imuni odgovor na navedeni konjugat je uspoređen sa trisaharidnim-tetanus toksoidnim konjugatnim cjepivom. Pokazano je da glikopolimer inducira snažniji imuni odgovor sa većim titrom trisaharid specifičnih antitijela i sa značajno većim odgovorom miševa koji razvijaju protutijela koja vežu metu, antigen nativnog staničnog zida kandide. (Lipinski i sur.,2011)

U narednoj studiji Bundle i suradnici su uspijeli iskoristiti protutijela kako bi identificirali cjepivo minimalnog disaharidnog epitopa koje može zaštititi zečeve od gljivične infekcije, ukoliko se izlože živoj Candidi albicans. (Bundle i sur., 2012)

4.6.6 Sintetska glukozaminska cjepiva koja prepoznaju PNAG

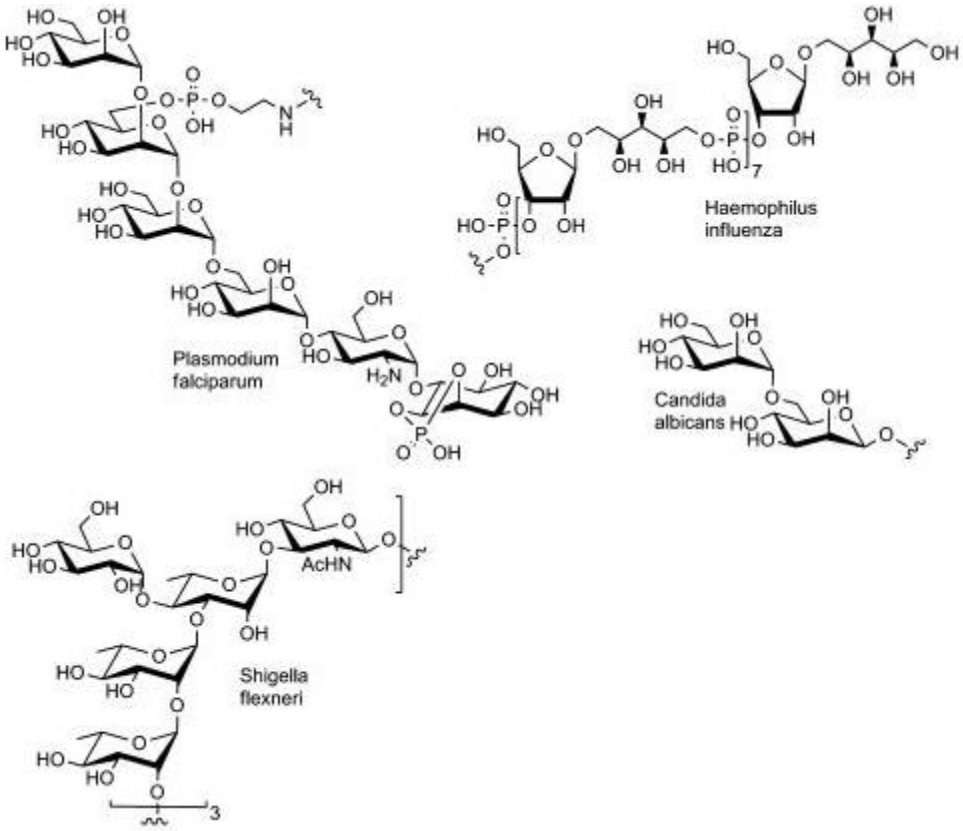
Pierov i Nifantiev labaratorij je prijavio seriju oligoglukozaminskih cjepiva koja prepoznaju β-(1-6)-poli-N-acetil-d-glukozamin (PNAG).

Cjepiva za patogene uobičajeno ciljaju soj-specifične površinske antigene ili toksine te vrlo rijetko postoji antigena specifičnost koja se proteže na više vrsta. Protektivna antitijela su obično specifična za kapsularne ili površinske antigene. β-(1-6)-poli-N-acetil-d-glukozamin je površinski polisaharid kojeg eksprimiraju brojni patogeni, uključujući Staphylococcus aureus, Escherichiu coli, Yersiniu pestis, Bordetellu pertussis, Acinetobacter baumanni i ostale.

Produkcija antitijela na PNAG je stimulirana ukoliko se primjeni deacetilirana gllikoforma (deacetilirani PNAG; <30% acetata) u konjugiranom cjepivu, dok visoko acetilirani PNAG ne inducira produkciju istih.

Gening i suradnici su sintetizirali cjepivo sastavljeno odβ-(1-6)-poli-glukozamina (Glc-NH2 od 5 i 9 saharidnih jedinica) konjugiranih na tetanus toksoid. Navedeno cjepivo je izazvalo produkciju mišjih antitijela koja posreduju opsonično ubijanje različitih sojeva S.aureus.

Zečja antitijela na $_{9}$Glc-NH2-tetanus toksoid posreduju ubijanje S.aureus i E.coli, štite od kožnih apscesa uzrokovanih S.aureusom te od letalnih peritonitisa uzrokovanih Escherichiom coli. Navedeno cjepivo bi potencijalno moglo biti iskorišteno za izazivanje protektivne imunosti na širok spektar patogena koji produciraju površinske PNAG. (Gening i sur.,2010)



Slika 10, Sintetska cjepiva bazirana na ugljikohidratima, reprezentativna cjepiva protiv mikrobnih patogena (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111574/figure/F4/)

4.6.7 Razvoj cjepiva usmjerenih na glikopeptidne antigene HIV-a

Iako su antiretroviralni lijekovi u velikoj mjeri unaprijedili preživljavanje HIV pacijenata, visok trošak tih lijekova u kombinaciji sa pojavom rezistencije čini preventivne vakcine naj atraktivnijim dugoročnim rješenjima u borbi protiv globalnih pandemija uzrokovanih virusom. Većina cjepiva dizajnirana da inducira odgovor neutralizirajućih protutijela sadrže proteine gp 120 i/ili gp 41 HIV ovojnice. No nažalost, takva cjepiva ne pokazuju dovoljnu učinkovitost ili širinu u neutralizaciji različitih HIV sojeva prisutnih u prirodi. (Esparza,2013)

Međutim, opsežne studije HIV pozitivnih pacijenata pokazuju veliku širinu podataka o potentnim široko neutralizirajućim antitijelima koja se stvaraju kod nekih inficiranih individua. Sada je sve jasnije kako većina antitijela vežu epitope na gp120, djelomično ili isključivo sastavljene od oligosaharidnih podjedinica.

Nadalje, u slučaju široko neutralizirajućih protutijela koja vežu peptidne epitope, kao što je CD4 mjesto vezanja, postoje dokazi kako određeni glikani sterički maskiraju područje te ometaju prepoznavanje potrebno za iniciranje odgovora protutijela.

Novije strategije dizajniranja anti-HIV cjepiva iskorištavaju navedeno znanje, bilo to produkcijom glikoziliranih antigena koji oponašaju epitope vezanja protutijela ili kroz inženjerstvo fragmenata glikoproteina kojima nedostaju određeni maskirajući glikani. (Horiya i sur., 2014)

4.6.7.1 Protutijela kao predlošci za dizajn cjepiva

Tipična antitijela na HIV ili na rekombinantne monomerne gp120 glikoproteine nisu u mogućnosti neutralizirati različite sojeve HIV-a iz više razloga. Naime, ne-neutralizirajuća antitijela vežu površine koje su dostupne samo na monomernom gp120 koji se odvojio od površine virusa, prema tome nisu u mogućnosti vezati i neutralizirati sam virus. Te iste površine vezanja nisu dostupne na intaktnom gp120 trimeru koji se nalazi na membrani virusa.

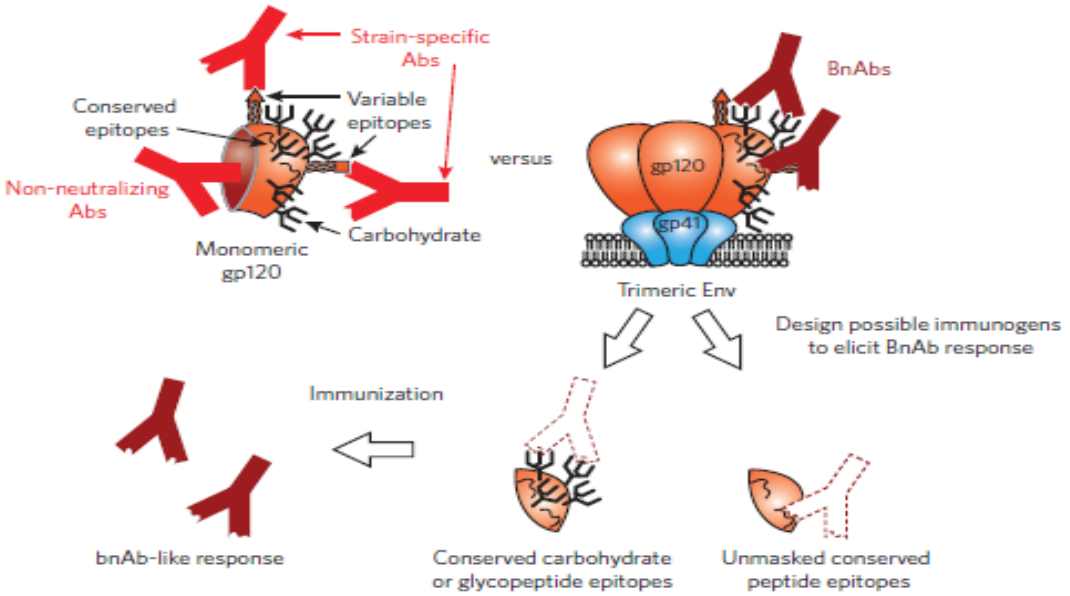
Druga antitijela pak mogu vezati trimerni gp120 na virusu, no ciljaju ne-konzervirane dijelove glikoproteina te su neutralizirajući ali također soj specifični. Nasuprot tome, svako široko neutralizirajuće protutijelo (bnAbs) cilja konzerviranu površinu koja je dostupna na trimeru.

Ukoliko epitop široko neutralizirajućeg protutijela (površina za koju se veže) može biti određen, informacija može poslužiti kao baza za dizajn cjepiva. U principu, strukture koje precizno oponašaju epitop na koje se veže antitijelo te ne sadrže druge viralne glikoproteinske elemente, bi mogle biti vrlo korisna cjepiva jer bi antitijela producirana protiv mimetičkih konskukta bila fokusirana na epitope, te tako u širokom spektru neutralizirala čestice virusa. (Slika 11) (Horiya i sur., 2014)

Iako ova logika zvuči vrlo privlačno, u praksi se javljaju brojni izazovi. Prvo, za antitijela koja vežu ugljikohidratne epitope, heterogenost HIV glikozilacije može u velikoj mjeri otežati precizno definiranje strukture koja čini epitop.

Nadalje, epitopi mogu biti sastavljeni od više glikanskih ili peptidnih fragmenata koji nisu stalni u HIV polipeptidnoj sekvenci, tako da ih je teško oponašati sa malim dizajniranim peptidima ili glikopeptidima.

U konačnici, čak i kada se dizajniraju strukturni mimici epitopa koji su u velikoj mjeri antigenični (antitijela ih prepoznaju u jednakoj mjeri kao i prirodne epitope na viralnim glikoproteinima), oni nemoraju pokazivati imunogeničnost, tj. ne moraju nužno izazivat imuni odgovor. Ukoliko i jesu imunogenična, rezultirajuća antitijela mogu pokazati nedovoljno vezanje viralnih epitopa te nemogućnost neutraliziranja virusa. Ipak, visoko antigene strukture su poželjne u dizajnu cjepiva. (Horiya i sur., 2014)



Slika 11, Ne- neutralizirajuća i stanično specifična antitijela te široko neutralizirajuća protutijela (bnAbs). BnAbs se vežu samo na konzervirane epitope locirane na gp120 trimeru. Imunogeni koji izlažu konzervirane epitope mogu usmjeriti imuni odgovor te inicirati stvaranje antitijela sa posebnom specifičnošću. (Horiya i sur., 2014, Recent strategies targeting HIV glycans in vaccine design;Figure 1)

4.6.7.2 Struktura i glikobiologija HIV ovojnice

Funkcionalne proteinske šiljke HIV-a (Env proteini) čine tri simetrična gp120 proteina od kojih je svaki nekovalentno vezan na transmembranski gp41 protein. Gp120 je odgovoran za prepoznavanje CD4 receptora na T stanicama, dok je gp41 odgovoran za mehaniku fuzije viralne i membrane domaćina. (Earl i sur., 1990)

Gp120 je posebno neobičan jer njegova polipeptidna sekvenca sadrži približno 25 mjesta N-vezane glikozilacije, dok tipični glikoproteini sisavaca sadrže mnogo manje. Glikani, koji čine otprilike 50% od totalne mase gp120, pružaju dvije bitne usluge virusu HIV-a.

Prvo, manozni ostaci glikana vežu DC-SIGN receptore na dendritičkim stanicama, omogućavajući virusu da se akumulira na površini tih stanica i ubrzavajući prezentaciju T-stanicama, što omogućuje infekciju.

Drugo, zbijeni glikani sterički maskiraju osnovnu polipeptidnu površinu te onemogućuju interakcije sa potencijalno neutralizirajućim protutijelima, stoga ih se ponekad naziva „glikanskim štitom“.

S obzirom da su glikani funkcionalno potrebni, djelomično su konzervirani, tako da antitijela koja ih vežu (npr. široko neutralizirajuća protutijela: 2G12, PGT, PG9/16) mogu neutralizirati vrlo širok spektar viralnih sojeva. Čak 80% cirkulirajućih sojeva može biti neutralizirano jednim antitijelom.

Što je najvažnije, neka od protutijela pokazuju protektivni učinak in vivo.

Kako bi dizajnirali cjepiva koja aktiviraju 2G12-slična ili PG9-slična protutijela, više grupa znanstvenika je radilo na dizajnu ugljikohidratnih klastera koji oponašaju epitope na koje se vežu široko neutralizirajuća antitijela.(Horiya i sur., 2014)

Idealno, dizajn glikostruktura, koje bi oponašale HIV glikopeptidne epitope, bi trebao biti baziran na detaljnom znanju o gllikozilaciji gp120. Međutim, preciznu karakterizaciju HIV glikozilacije je vrlo teško postići. Gp120 glikozilacija osim što je heterogena, također ovisi o HIV soju, stupnju infekcije, tipu producirajućih stanica kao i o oligomernoj formi.(Horiya i sur., 2014

4.6.7.3 Dizajn 2G12-ciljanih cjepiva

2G12, izoliran iz seruma HIV pozitivnih pacijenata, je antitijelo koje je pokazalo visoku aktivnost neutralizacije te prvo koje veže ugljikohidrate gp120 glikoproteina. Napravljeni eksperimenti su pokazali da 2G12 veže klaster od 2 do 4 visoko manozna glikana ($Man_8GlcNAc_2$ i/ili $Man_9GlcNAc_2$). (Horiya i sur., 2014)

Kristalografijom X-zrakama je dobiven model 2G12-gp120 interakcije. Kristalna struktura otkriva jedinstvenu dimernu strukturu izmijenjenih domena; varijabilne domene teškog lanca (Vh) se izmjenjuju te formiraju produženu površinu vezanja koja osim dva Vh/Vl (domena lakog lanca) kombinirana mjesta uključuje i Vh/Vh', što u velikoj mjeri povećava afinitet između ugljikohidrata i antitijela prema nanomolarnom rasponu. (Doores i sur., 2010)

Dakle Vh podjedinica svakog antitijela je uparena sa Vl domenom drugog, što približava antitijela te formira jednu veliku površinu prepoznavanja antigena. Tako je 2G12 u mogućnosti vezati više gusto pakiranih manoznih ostataka. Dakle, klaster visoko manoznih šećera na gp120 stvara nove epitope koji su od imunog sustava prepoznati kao strani te su krajnja meta protutijela 2G12 izmijenjenih domena. Strukturalne studije, testovi vezanja, enzimatske hidrolize i mutacijske analize su istaknule terminalne manozide kao ključni motiv vezanja za 2G12. (Doores i sur., 2010)

Dok $Man_9GlcNAc_2$ veže 2G12 sa Kd ~180mM, njegova multivalentna prezentacija na gp120 pokazuje 36 000 puta veće prepoznavanje sa Kd~5nM. Nadalje, specijalna struktura 2G12 je esencijalna; eliminiranjem značajki izmjena domena mutagenezom 2G12, virtualno neće doći do vezanja na gp120. (Horiya i sur., 2014)

Jedinstven način vezanja otkriva potencijalne strategije konstruiranja cjepiva, koje bi bile dostupne ciljanjem konzerviranih oligomanoznih klastera na gp120 kao antigena.

Potencijalna terapeutska vrijednost 2G12 epitopa, kao atraktivnih meta za anti-HIV cjepiva, je nedavno istaknuta pronalaskom da 2G12 može od HIV-a zaštiti makaki majmune u okvirima mnogo nižeg titra od većine ostalih široko neutralizirajućih protutijela. (Doores i sur., 2010)

Bazirani na navedenim informacijama, mnogo grupa znanstvenika radi na dizajnu cjepiva, oligomanoznih klastera koji mogu oponašati 2G12 epitop te stimulirati odgovor 2G12-sličnih antitijela. Oligomanozni konstrukti mogu biti evaluirani u okvirima dva kriterija: antigeničnosti, tj. njihovog afiniteta vezanja za 2G12 te imunogeničnosti, tj. sposobnosti da stimuliraju odgovor 2G12-sličnih antitijela in vivo. Iako je visoka antigeničnost epitopskih mimika poželjna, nije nužno dovoljno jamstvo željene imunogeničnosti. Nije poznato dali je neki antigen dobar imunogen sve dok ne prođe studije animalne imunogeničnosti.(Horiya i sur., 2014)

4.6.7.4 Dizajn PG9 i PG16- ciljanih cjepiva

Do 2009, 2G12 je bilo jedino prijavljeno široko neutralizirajuće HIV protutijelo čija jedinstvena struktura izmijenjenih domena predstavlja izazov za razvoj cjepiva.

Od 2009. god. high-throughput screeningom klonova B-stanica, dobivenih iz pacijenata, nađeni su deseci novih glikan-vežućih monoklonskih protutijela koja, za razliku od 2G12, nemaju izmijenjene domene već su konvencionalne Y/T topologije protutijela.

Prva nova protutijela ove klase, PG9 i njemu slično PG16 protutijelo, neutraliziraju HIV sa većom širinom i učinkovitošću nego 2G12 protutijela. Tako da se navedena protutijela smatraju bitno poboljšanim predlošcima za dizajn cjepiva.

Za dizajn imunogena koji mogu omogućiti nastanak PG9 i PG16-sličnih protutijela, potrebno je detaljno poznavanje strukture na koju se ova široko neutralizirajuća protutijela vežu.

PG9 i PG16 se preferirano vežu na trimer gp120. Mutacijske studije pokazuju kako je za vezanje potrebno potencijalno mjesto N-vezane glikozilacije na poziciji N160. Kristalografske studije x zrakama pokazuju da PG9 stupa u opsežne kontakte sa $Man_5GlcNAc_2$, visoko manoznim glikanom na poziciji N160, dok je kontakt slabiji sa glikanima koji se nalaze na prostorno bliskim pozicijama, N156 i N173.(Horiya i sur., 2014)

Danishefskyeva grupa je prijavila sintezu glikopeptida koji sadrži epitop za PG9 antitijelo. Sintetizirani glikopeptid sadrži dva blisko razmaknuta N-glikana na pozicijama N160 i N156 gp120, te se sa velikim afinitetom može vezati na PG9 antitijelo, dok sam glikan nije dobar ligand. (Aussedat i sur., 2013)

4.6.7.5 Pogled u budućnost

2G12, sa svojom jedinstvenom strukturom izmjenjenih domena, dugo je vremena bilo jedino poznato HIV široko neutralizirajuće protutijelo za koje je poznato da veže ugljikohidrate, stoga se javila zabrinutost kako je glikanski štit suviše neobična meta da bi poslužila u dizajnu HIV cjepiva.

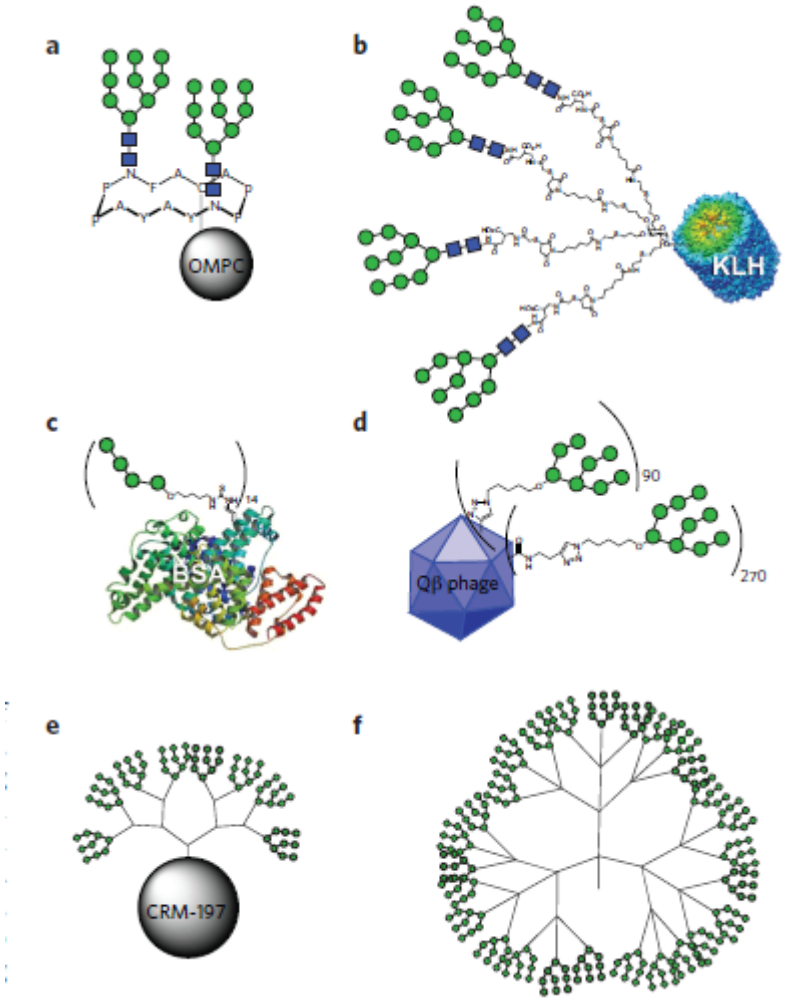
Otkrićem više od desetak antitijela PG i PGT skupine sada je jasno da su glikanski epitopi najčešća meta imunog sustava.

Iako novo otkrivena antitijela, za razliku od 2G12, sva imaju konvencialnu Y/T topologiju, ipak su u velikoj mjeri mutirala od stanica predaka. Kako bi se potaknuo odgovor takvih neuobičajenih protutijela, vjerojatno će biti potrebno koristiti adjuvanse ili posebne režime cijepljenja koji će maksimalno potaknuti maturaciju.

Iako većina novije otkrivenih protutijela pokazuju veliku širinu neutralizacije, vjerojatno će biti neophodno dizajnirati multivalentna cjepiva kojima će cilj biti produkcija više široko neutralizirajućih protutijela, kako bi se postigla dovoljno visoka razina zaštite.

Na sreću, napori dizajniranja ugljikohidratnih cjepiva su podržani kontinuiranim napretkom metoda za analizu glikana, glikoinženjerstvom proteina, kemoenzimatskim i kemijskim sintezama te računalnim i evolucijski-baziranim dizajnom glikostruktura.

(Horiya i sur., 2014)



Slika 12, Izabrani multivalentni visoko-manozni antigeni glikanskih klastera (Horiya, MacPherson, Krauss ; Recent strategies targeting HIV glycans in vaccine Design, Figure 5)

a) Dvovalentni ciklički peptid sa dva $Man_9GlcNAc_2$ glikana, povezana pomoću asparagina, konjugirana na vanjsku membranu proteinskog kompleksa vanjske membrane (OMPC) Neisseirie meningitidies kao proteina nosača
b) Tetravalentni $Man_9GlcNAc_2$, fleksibilno povezan na galaktoznu ovojnicu, konjugiran na KLH protein nosač
c) Man_4 konjugirana (14 kopija)kratkom poveznicom na BSA protein nosač
d) Heteromultivalentni klasteri Man_8 i Man_9 konjugirani na čestice Qβ faga
e) $PANAM_8$-Man_9 dendrimerni konjugati (dvije kopije) na CRM-197 proteinu nosaču (Diphtheria toxoid)
f) Visoko multivalentni Man_9 dendrimeri

4.6.8 Antitumorska sintetska cjepiva

Karcinom je jedan od glavnih uzroka smrti diljem svijeta. U 2012. god. je od karcinoma umrlo oko 8,2 milijuna ljudi, a Svjetska Zdravstvena Organizacija predviđa da bi se mortalitet mogao povećati na 80% do 2030-te. Međutim, usprkos nedavnom napretku u liječenju tumora, trenutni režim terapije je još uvijek manjkav zbog nepodnošljivih nuspojava i često nepotpune eliminacije tumora. Zbog navedenih razloga, rade se opsežna istraživanja kako bi se razvile inovativne medicinske strategije sa ciljem zaštite i/ili liječenja populacije od karcinoma. Među njima, pristup baziran na imunoterapiji spada u obećavajuće alternative.

Sintetska i polusintetska cjepiva su pokazala impresivne rezultate u animalnim modelima, primijenjena sama ili u sinergiji sa drugim metodama liječenja. No, većina glavnih problema i hipoteza vezanih uz anti tumorska cjepiva zahtjeva daljnje istraživanje. (Nativi, Renaudet, 2014)

Ukratko, velika većina antitumorskih cjepiva su sastavljena od tumor-povezanih ugljikohidratnih antigena (TACA) eksprimiranih na površini malignih stanica i imunogenih proteina ili lipopeptidnih nosača. (Wilson i sur., 2013)

Zapravo je sada prihvaćeno da je kombinacija ovih strukturalnih elemenata, unutar jedne molekule, potrebna za induciranje imunog odgovora, što vodi do stvaranja IgG protutijela protiv stanica tumora koje eksprimiraju iste TACA. Također, dolazi do induciranja aktivacije B-stanica dugotrajne memorije te citotoksičnih T-stanica.

Međutim, do sada se većina prijavljenih cjepiva nisu pokazala zadovoljavajućim u naprednim kliničkim studijama. Razlog tome su različite prepreke, kao npr. nedovoljna molekularna definicija, niska selektivnost i reproducibilnost imunog odgovora te nedostatak dodatnih strategija. U daljnjem tekstu će biti istaknuti veći napredci u dizajnu ugljikohidrat baziranih sintetskih cjepiva koja otvaraju nove perspektive u imunoterapiji karcinoma.(Nativi, Renaudet, 2014)

4.6.8.1 Antitumorska cjepiva sa više kombiniranih ugljikohidratnih antigena

Orijentir postignuća na ovom području je postavio Danishefsky sa suradnicima. Potaknuti heterogenošću tumorskog glikokaliksa te evolucijom TACA tijekom progresije bolesti, postavili su hipotezu insercije različitih TACA unutar istog cjepiva, što može inducirati veliku širinu odgovora protiv tumora i na taj način osigurati potpuno uništavanje tumora u različitim stadijima bolesti. S tim ciljem, navedena grupa znanstvenika je dizajnirala sintetski unimolekularni, pentavalentni peptid koji kombinira 5 tumor povezanih ugljikohidratnih antigena koje eksprimiraju tumori prostate i dojke, tj. Globo-H, GM2, STn, TF, i Tn konjugiran na Keyhole limpet hemocijanin (KHL) nosač u visokom omjeru epitopa (tj., 505/1). (Zhu i sur.,2009)

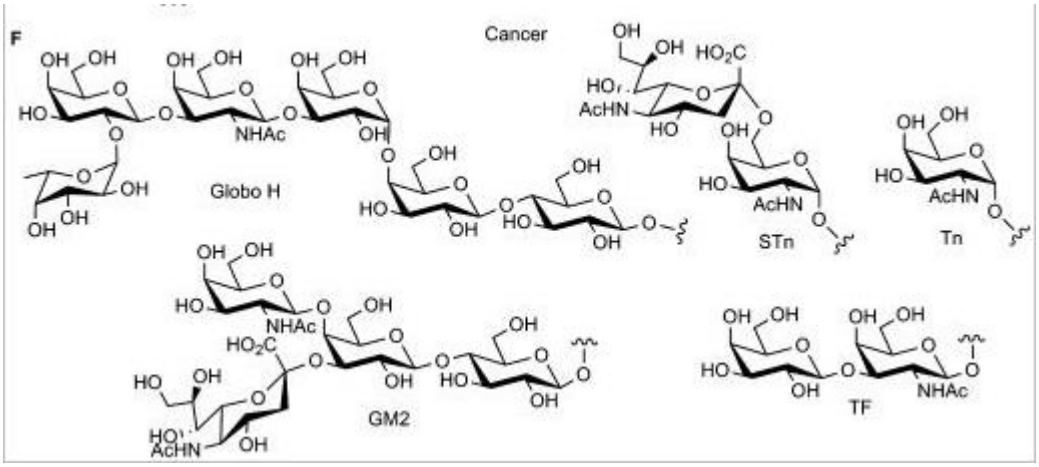
Naknadne imunološke studije, koje su koristile QS-21 kao adjuvans, otkrivaju produkciju IgG i IgM protutijela usmjerenih protiv svakog TACA u sličnijim titrima nego kod korištenja monoantigenih cjepiva. Nadalje je protočnom citometrijom pokazano da producirana IgG i IgM protutijela reagiraju sa staničnim linijama karcinoma dojke koje eksprimiraju gore navedene antigene.(Nativi, Renaudet, 2014)

Nakon dugoročnih istraživanja glikopeptidnih antigena ponavljajućih sekvenci mucina (MUC1 epitelnih tumorskih stanica), Kunz i suradnici su sintetizirali cjepivo sastavljeno od MUC1 glikopeptida sa Tni STn antigenima, koji su dodatno konjugirani na BSA (goveđi serumski albumin) nosač.

Tn i STn antigeni su dva najučestalija, tumor povezana ugljikohidratna antigena. Eksprimirani su u više od 80% karcinoma te se pojavljuju na više izlučenih i površinskih glikoproteina i mucina. (Ju i sur., 2008)

Imunizacijom Balb/c miševa je zamijećen izvanredan odgovor antitijela sa pretežnim IgG1 izotipom antitijela i snažnim vezanjem na MCF-7 staničnu liniju tumora dojke.(Cai i sur., 2012)

Provedene studije su demonstrirale kako bi buduća cjepiva kandidati mogli pokazati puno veću uspješnost, tj. unaprijediti imunološki odgovor na temelju više tumor povezanih ugljikohidratnih antigena umjesto na jednom. (Nativi, Renaudet, 2014)



Slika 13, Tumor povezani ugljikohidratni antigeni;
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111574/figure/F4/)

4.6.8.2 Razvoj samo-adjuvantnih („self-adjuvating“), multikomponentnih cjepiva

Dok konjugirana cjepiva djeluju obećavajuće u razvoju tumorskih terapeutskih cjepiva, nerazdvojiva imunogeničnost proteina nosača je odgovorna za supresiju imunog odgovora prema željenim TACA ili glikokonjugatnim epitopima. (Nativi, Renaudet, 2014)

Kako bi se izbjegao anti-protein nosač imuni odgovor, Boons i suradnici su predložili samo-adjuvantna, multikomponentna cjepiva.

Navedena cjepiva uključuju Pam3CysSerK4 (sintetski triacilirani lipopeptid, ligand Toll-like receptora 2) i dodekapeptid sa ugljikohidratnim ostacima Tn antigena (GalNAcα-Ser/Thr). Kao odgovor na takvo cjepivo su dobiveni viši titri IgG protutijela. (Ingale i sur., 2009)

Sa saznanjem da TLR2 ligandi mogu pojačati lokalnu upalu, što vodi do aktivacije adaptivnih komponenata imunog sustava, Payne i suradnici su nedavno sintetizirali cjepiva koja inkorporiraju MUC1 peptid kao epitop B-stanica, kovalentno vezan na Pam3CysSer kao TLR2 ligand.

Cjepivo također može sadržavati peptid tetanus toksina kao pomoćni epitop za T-stanice. Trikomponentna cjepiva koja sadrže i pomoćni epitop za T-stanice pokazala su značajno veću imunogeničnost nego dikomponentna cjepiva. (Wilkinson i sur., 2011)

Glikozilirana MUC-1 cjepiva su u mišjim modelima izazvala visoku razinu IgG protutijela, u odsudstvu vanjskog pomoćnog sredstva, liposomalne preparacije ili proteina nosača.(Nativi, Renaudet, 2014)

Renaudet i suradnici su opisali prvi primjer samo-adjuvantnog četiri komponentnog cjepiva. Ova nova generacija cjepiva unutar ciklopeptidne ovojnice sadrži klaster Tn antigena kao epitopa B-stanica, pomoćni peptidni epitop T-stanica (PADRE), citotoksični peptidni epitop T-stanica (HER) i agonist TLR-2 (palmitinska kiselina). (Renaudet i sur., 2010)

Imunološke studije na miševima su pokazale tumorsku regresiju i značajno veću stopu preživljavanja bez primjene vanjskog adjuvanta. Daljnja istraživanja staničnih i molekularnih mehanizama ukazuju na značajan utjecaj pozicije lipidne skupine u peptidnoj sekvenci na jačinu odgovora B-stanica i citototoksičnih T-limfocita. (Nativi, Renaudet, 2014)

Stupanj glikozilacije je vrlo bitno pitanje kod aktivacije citotoksičnih T-limfocita i IgG protutijela protiv karcinom eksprimiranih MUC-1. Zapravo, neglikozilirane i vrlo gusto glikozilirane sekvence MUC1 pokazuju neučinkovitost. Minimalni zahtjevi za stimulaciju citotoksičnih T-limfocita i induciranje specifičnih protutijela, identificirani su u trojnom cjepivu koje su sintetizirali Boons i suradnci. Cjepivo sadrži tumor-povezane glikopeptide derivirane iz MUC1, poliovirus T-pomoćni epitop i Pam3CysSerK (ligand TLR2). (Lakshminarayanan,2012)

Multivalentna cjepiva su također dobivena sintezom na čvrstoj fazi, klik reakcijom spajanja MUC1 glikopeptidnog antigena i Pam3CysSerK4 lipopeptida. Cjepiva su podigla imuni odgovor kod miševa bez upotrebe vanjskih adjuvanta. Među njima, cjepivo koje je sadržavalo 4 kopije sijalil Tn antigena je također pokazalo izvanredan klaster učinak.(Nativi, Renaudet, 2014)

U drugom pokušaju pojednostavljenja MUC1 strukture cjepiva, naravno uz zadržavanje stimulirajućeg efekta, MUC1 ponavljajući glikopeptid je spojen na tri poznata peptidna epitopa T-pomoćnih stanica, derivirana iz tetanus toksoida. Ovo novo,di komponentno

cjepivo inducira mnogo jači imuni odgovor kada se primjeni u čistom puferu nego u Frendovom adjuvantu.(Cai i sur., 2013)

4.6.8.3 Upotreba mimetičkih antigenih struktura u razvoju cjepiva

S obzirom na izuzetno snažne imuno reakcije inducirane sintetskim cjepivima sa izraženim sialil Tn antigenom spojenim na tetanus toksoid kao protein nosač, Kunz i suradnici su sintetizirali novo cjepivo sastavljeno od tetanus toksoida i MUC1 glikopeptida sa T-antigenom ili stabilnijim mimetikom T-antigena. Mimetik T-antigena je karakteriziran dvama fluornim supstituentima na pozicijama 6- i 6-' piranoznih prstena. Snažan i selektivan imuni odgovor je izazvan sa oba navedena cjepiva što pokazuje da primarne OH skupine ugljikohidratnog dijela glikopeptidnog antigena mogu biti zamijenjene fluorom bez smanjenja imunogenosti i selektivnosti konstrukta. (Hoffman-Röder, 2011)

Sa poštovanjem cjepivima koja sadrže prirodne antigene strukture, ona koja sadrže mimetičke bi trebala pokazivati bitne prednosti u okvirima manje osjetljivosti na enzimatsku degradaciju. Dakle, kako bi se unaprijedila stabilnost prema glikozidazama i poboljšala in vivo bioraspoloživost, predložene su strukturne modifikacije nativnih antigena. (Nativi, Renaudet, 2014)

Nedavno je prijavljeno potpuno sintetsko cjepivo sastavljeno od 4 klastera mimetika Tn antigena i imunostimulacijskog peptida (OvaPADRE) konjugiranog na ciklopeptidnu okosnicu. Ovaj prototip cjepiva je izazvao snažan i dugo-djelujući odgovor IgG/IgM protutijela te mehanizmima posredovanim B-stanicama inducirao zaštitu u miševima. (Richichi, 2014)

4.6.8.4 Prekretnice u terapiji karcinoma

Zaključno, od uvođenja hipoteza o imunoterapiji tumora, sintetska cjepiva predstavljaju prekretnice na području netradicionalnih terapija karcinoma. U gornjem tekstu su posebno istaknuti obećavajući napredci u dizajnu sintetskih cjepiva, kao što su upotreba više tumor povezanih ugljikohidratnih antigena unutar istog cjepiva, zamjena vanjskog adjuvanta samo-adjuvantnom multikomponentnom vakcinom i začetak korištenja mimetičkih antigenih struktura.

4.6.9 Buduća perspektiva ugljikohidratnih cjepiva

Ugljikohidratni antigeni predstavljaju značajan izvor za razvoj cjepiva protiv infektivnih agensa, pogotovo protiv patogena za koje pristupi tradicionalnih proteina i pristupi bazirani na cijelom organizmu nisu uspješni.

Povećava se broj radova koji istražuju cjepiva bazirana na ugljikohidratima za postizanje humoralne i celularne imunosti usmjerene na tumore.

Razvijaju se nova ugljikohidratna cjepiva za patogene kao što su HIV i uzročnik malarije. Postaje sve jasnije kako različite strukture i načini prezentacije glikotopa utječu na način na koji ih tijelo percipira i procesira te diktiraju imuni odgovor protiv njih. Identificiraju se novi putevi procesiranja glikotopa, rasvjetljuju se signali i molekule uključene u aktivaciju stanica te se razvijaju nove sintetske i „microarray“ tehnologije koje će dozvoliti nove eksperimentalne pristupe koji će omogućiti istraživanje interakcija imunog sustava sa vlastitim i tuđim glikanima. (Lucas i sur., 2005)

4.7 Glikoinženjerstvom proteina do poboljšane efikasnosti i terapijske učinkovitosti

Većina proteinskih terapeutika se proizvode kao smjese različitih glikoformi, gdje pojedina glikoforma ima određena svojstva i biološku aktivnost. Glikozilacija u velikoj mjeri može utjecati na zaštitu proteina od proteolize te na povećanje stabilnosti i topljivosti. Dodatno, svaka proteinska glikoforma može dovesti do različitog biološkog odgovora sa razlikama u farmakodinamici i efektornim funkcijama. Nažalost, izoliranje homogeno glikoziliranih produkata i definiranje njihovih in vivo i in vitro funkcija ostaje prilično obeshrabljujući zadatak. (Hudak, Bertozzi., 2014). Čak i u pojednostavljenom slučaju ljudskih IgG protutijela, koja imaju samo jedno mjesto N-glikozilacije, na svakom od dva teška lanca, moguć je pronalazak i do 500 različitih glikoformi. (Jefferis, 2009)

Proteinski terapeutici se moraju konstantno pratiti jer čak i „blockbuster" lijekovi pokazuju promjene u statusu glikozilacije kroz određeno vrijeme.

Razvijene su dvije taktike koje omogučuju produkciju homogeno glikoziliranih produkata. Prva taktika prihvaća kemijski definirane pristupe, koristeći sintetsku metodologiju stvaranja glikozidnih veza na sitetetskim ili rekombinantnim proteinima. Druga pak koristi inžinjerske enzimatske puteve in vitro ili u samoj ekspresiji domaćina, kako bi omogučila nastanak čistih proteinskih glikoformi. (Benett, Wong., 2007.)

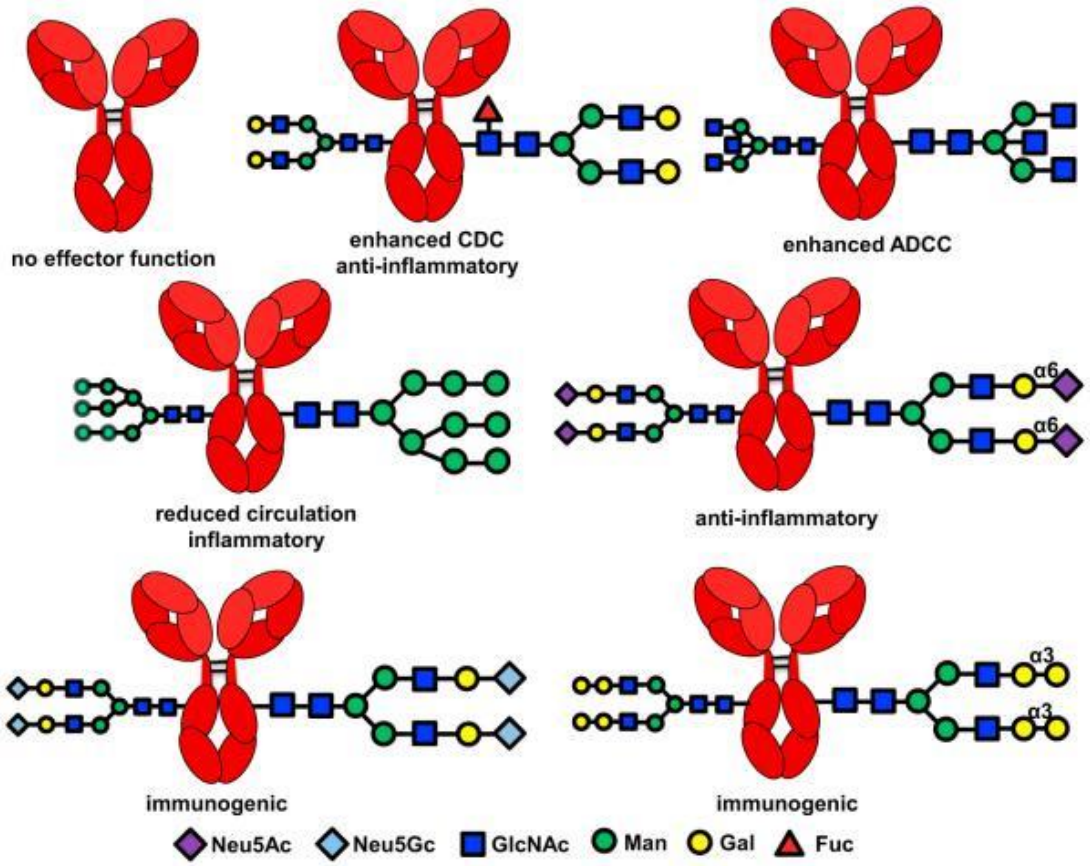
4.7.1 N-glikozilacija IgG protutijela

Početkom 1980-ih postala je jasna važnost N-glikozilacije IgG protutijela, osim za njihovu sekreciju, pri utvrđivanju efektornih funkcija antitijela kroz protutijelo-ovisnu celularnu citotoksičnost (ADCC) i aktivaciju komplementa. (Slika 14) Također je pokazana važnost konzerviranih N-glikana na poziciji Asn297 za vezanje na Fc receptore stanica imunog sustava. (Hudak, Bertozzi., 2014)

Navedena istraživanja su dovela do inženjerstva stanica jajnika kineskog hrčka (CHO) i stanica bubrega ljudskog embrija (HEK), što je omogučilo produkciju specifičnih struktura glikozilacije usmjerenih prema određenim funkcijama i specifičnim terapeutskim aplikacijama. Rad je započeo linijom CHO stanica, kao stanica domaćina, sa pojačanom ekpresijom β-1,4-N-acetilglukozaminiltransferaze III (GnIII) koja dodaje GlcNac na N-glikansku jezgru. (Hudak, Bertozzi., 2014)

Antitijela, dobivena iz ovih stanica, su pokazala znatan porast protutijelo-ovisne celularne citotoksičnosti te povećanu efikasnost ubijanja stanica karcinoma. Kasnije je otriven razlog povećane ADCC. Naime, dodavanje N-acetil-glukozamina na glikansku jezgru onemogučilo je fukozilaciju Fc regije (defukozilirana Fc regija je dominantno obilježje povećane ADCC). Daljnji trud je uložen u produkciju ne-fukoziliranih antitijela sa povećanim afinitetom vezanja prema Fc receptorima. (Satoh et al., 2006) Nedavno je Seattle Genetics razvio 2-fluorofukozu, inhibitora koji smanjuje fukozilaciju in vivo i in vitro te omogućuje produkciju antitijela povećane ADCC. (Okeley et al., 2013)

Osim za proupalna svojstva, status glikozilacije IgG protutijela je također bitan za protu-upalni učinak. Intravenozna terapija gama globulinima, u kojoj se injektira heterogena populacija IgG protutijela, provodi se desetljećima u liječenju upalnih bolesti. (Dwyer, 1992) Ravetcheva grupa istraživača je prva demonstrirala kako do izraženih protu-upalnih svojstava dolazi zbog sializacije N-glikana Fc regije. α 2,6- vezana sijalinska kiselina smanjuje afinitet aktivacije Fcγ receptora-III, dok istovremeno povećava ekspresiju inhibitornog Fcγ receptora-IIB (FcγRIIB). (Kanenko i sur., 2006)
Galaktozilacija N-glikana IgG-a se također pokazala bitnom u unapređenju kooperativnog signaliziranja FcγRIIB sa dektinom-1, što rezultira inhibitornim putevima koji blokiraju kaskadu komplementa i proinflamatorne efektorne funkcije. (Karsten et al., 2012)



Slika 14, Utjecaj glikozilacije na funkcije IgG antitijela.

Ne-glikozilirana IgG antitijela ne vežu Fc receptore i ne aktiviraju komplement, dok dodatak različitih sijalinskih kiselina može izazvati protu-upalni ili imunogenični učinak (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111574/figure/F5/)

4.7.2 Važnost glikozilacije eritropoetina i drugih proteinskih terapeutika

Opseg i sastav glikana, osim na gore navedena antitijela, može utjecati i na učinkovitost mnogih drugih terapeutskih proteina. Rekombinantni eritropoetin (EPO) se široko koristi za liječenje anemije, no njegova ekspresija u stanicama domaćina sisavaca mora biti strogo praćena. Naime, sijalizacija N-glikana u velikoj mjeri može utjecati na farmakokinetiku terapeutika.

Zapravo, glikozilacija utječe na in vivo stabilnost u tolikoj mjeri da uklanjanje glikana smanjuje vrijeme poluživota u glodavaca, sa 5-6 sati na manje od dvije minute. (Erbayraktar i sur., 2003).

Koristeći navedena opažanja kao inspiraciju, Amgen je dizajnirao hiperglikoziliranu formu eritropoetina, darbepoetin alfa (Aranesp), koji posjeduje dva dodatna mjesta glikozilacije i tri puta prolongirano vrijeme poluživota u ljudi. Darbepoetin alfa je trenutno glavni izbor kod liječenja anemije. Naime, produženo vrijeme poluživota povećava potentnost i smanjuje broj potrebnih injekcija. (Elliot i sur., 2003)

Sadržaj sijalinske kiseline i opseg grananja N-glikana folikul-stimulirajućeg hormona (FSH) određuje in vitro aktivnost hormona, kao i njegovo in vivo zadržavanje u cirkulaciji. Uvođenje dva dodatna mjesta N-glikozilacije na FSH-u povećava njegovu veličinu i naboj, što dovodi do smanjenog renalnog klirensa i povećane bioaktivnosti (Perlman i sur., 2003)

Pristup dodavanja sijalinske kiseline je iskorišten za inžinjerstvo inzulina sa terminalnim 2,6-SialilLacNAc dendronom. Ovaj glikodendrimerni konstrukt je pokazao produženo vrijeme poluživota i povećanu in vivo potentnost u miševima, dok dodavanje LacNAc dendrimera nije imalo isti učinak. (Sato i sur, 2004)

Prethodno navedene metode uključuju proizvodnju rekombinantnih proteina u stanicama sisavaca. Međutim, ovi sustavi su skupi i vrlo osjetljivi na glikozilacijske promjene. Prema tome, ulaže se znatan napor kako bi se dizajnirali jednostavniji ekspresijski domaćini koji će proizvoditi određene glikoforme proteina. (Hudak, Bertozzi, 2014)

Gemgross i suradnicisu inženjerstvom proizveli stanice Pichie pastoris, domaćina koji može producirati terminalno sijalinizaran eritropoetin sa punom potentnosti u miševa.

Za uspoerdbu, stanice domaćina, koje nisu dobivene inženjerstvom, produciraju visoko manozne N-glikane sa minimalnom in vivo aktivnošću. (Hamilton i sur., 2006) Navedena tehnologija je korištena za produkciju, sijaliziranih ili nesijaliziranih, N-vezanih glikoforma rekombinantnog humanog laktoferina. Samo sijalizirana struktura je zadržala sposobnost zaštite imunih stanica od metotreksatom inducirane smrti. (Choi i sur., 2008)

4.7.3 Enzimski pristup glikanskoj postekspresiji

Umjesto inženjerstvom dobivenih ekspresijskih domaćina koji produciraju homogene glikane, moguć je i pristup enzimske promjene glikanske postekspresije. Klasični primjer enzimskog pristupa je opisan u radu Wittea i Wonga. Naime, stvorena je jedinstvena glikoforma ribonukleaze B kroz tretman glikozidazama i glikoziltransferazama. (Witte i sur, 1997) Ovaj tip inženjerstva se trenutno koristi za liječenje Gaucherove bolesti. Kako bi se ublažio poremećaj nedostatka enzima koriste se in vitro deglikozilirane (pomoću α-neuraminidaza, β-galaktozidaza i β-N-acetilglukozaminidaza) glukocerebrozidaze (imigluceraze) sa izloženim manoznim ostacima koji omogućuju internalizaciju. (Pastores, 2010)

Implementacijom aktiviranih donora kao supstrata, moguć je prijenos cijelih glikana u cilju produkcije homogeno glikoziliranih proteina.

Wang i suradnici su optimizirali metodu korištenja Endo-S (endoglikozidaza iz Streptococcus pyogenesa) mutanta kako bi kreirali potpuno sijalinizirana antitijela sa povećanom protu-upalnom aktivnošću i nefukozilirane glikoforme antitijela sa većim afinitetom prema FcγIIIa receptorima.(Huang i sur., 2012)

5. ZAKLJUČAK

Otkriće strukture dvostruke uzvojnice DNA, prije 80-tak godina, omogućilo je ulazak u novu eru biologije. Sposobnost sekvenciranja i promjene genetičkog koda dostižu vrhunac i mijenjaju način na koji pristupamo liječenju bolesti.

Danas se pak velika pažnja pridaje glikanima, proučavanju njihovih fizioloških uloga, jednako kao i njihovoj ulozi u patofiziologiji bolesti. Sukladno tome, javljaju se nove ideje i pristupi u liječenju bolesti. Zahvaljujući napretku u biološkoj i fizikalnoj kemiji, područje glikobiologije posjeduje alate potrebne za otkrivanje sekvence i strukture membranskih i na proteine vezanih glikana. Također su i pronađeni načini kojima se mogu mijenjati i iskorištavati funkcije različitih glikanskih struktura.

Farmaceuti, otkrićem uloge glikokonjugata i lektina u razvoju mnogih bolesti (karcinom, kardiovaskularne bolesti, mikrobne infekcije, neuralne bolesti, dijabetes...), postaju posebno zainteresirani za područje glikobiologije. Ugljikohidrati postaju logični kandidati za dizajn novih terapeutika. Pozitivna obilježja glikana, kao novih spojeva u razvoju lijekova, su njihova relativna sigurnost, specifičnost te stabilnost.

S obzirom na rastuće znanje i pokazan interes farmaceutskih kompanija za glikobiologiju i razvoj glikanskih terapeutika, opravdano je vjerovati kako nas u bliskoj budućnosti čeka mnoštvo novih ugljikohidratnih lijekova koji će, nadajmo se, omogućiti nov način liječenja dosad možda i neizlječivih bolesti.

6. LITERATURA

1. Adam EC, Mitchell BS, Schumacher DU, Grant G, Schumacher U. Pseudomonas aeruginosa II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 1997 155, 2102–2104.

2. Acarbose, http://www.drugs.com/pro/acarbose.html, Pristupljeno 1.5.2015.

3. Aussedat B, Vohra Y, Park PK, Fernández-Tejada A, Alam SM, Dennison SM, Jaeger FH, Anasti K, Stewart S, Blinn JH, Liao HX, Sodroski JG, Haynes BF, Danishefsky SJ. Chemical synthesis of highly congested gp120 V1V2 N-glycopeptide antigens for potential HIV-1-directed vaccines. *J Am Chem Soc*, 2013, 135, 13113-20.

4. Bajolet‐Laudinat O, Girod-de Bentzmann S, Tournier JM, Madoulet C, Plotkowski MC, Chippaux C, Puchelle E. Cytotoxicity of Pseudomonasaeruginosa internal lectin PA‐I to respiratory epithelialcells in primary culture. *Infect Immun*, 1994, 62, 4481–4487.

5. Becer CR. The glycopolymer code: synthesis of glycopolymers and multivalent carbohydrate-lectin interactions. *Macromol Rapid Commun*, 2012, 33, 742-52.

6. Becker B, Cooper MA, Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol*, 2013, 8, 105-15.

7. Bennett CS, Wong CH. Chemoenzymatic approaches to glycoprotein synthesis. *Chem Soc Rev*, 2007, 36, 1227-38.

8. Black S, Shinefield H. Safety and efficacy of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine: evidence from Northern California. *Eur J Pediatr*, 2002, 161, 27-31.

9. Bond MR, Hanover JA, O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease. *Annu Rev Nutr*, 2013, 33, 205-29.

10. Boutlis CS, Riley EM, Anstey NM, de Souza JB. Glycosylphosphatidylinositols in malaria pathogenesis and immunity: potential for therapeutic inhibition and vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 297, 145-85.

11. Bundle DR, Nycholat C, Costello C, Rennie R, Lipinski T. Design of a Candida albicans disaccharide conjugate vaccine by reverse engineering a protective monoclonal antibody. *ACS Chem Biol*, 2012, 7, 1754-63.

12. Cai H, Chen MS, Sun ZY, Zhao YF, Kunz HL, Self-adjuvating synthetic antitumor vaccines from MUC1 glycopeptides conjugated to T-cell epitopes from tetanus toxoid. *Angew Chem*, 2013, 52, 6106−6110.

13. Cai H, Huang ZH, Shi L, Sun ZY, Zhao YF, Kunz H. Variation of the glycosylation pattern in MUC1 glycopeptide BSA vaccines and its influence on the immune response. *Angew Chem*, 2012, 51, 1719−1723.

14. Choi BK, Actor JK, Rios S, d'Anjou M, Stadheim TA, Warburton S, Giaccone E, Cukan M, Li H, Kull A, Sharkey N, Gollnick P, Kocieba M, Artym J, Zimecki M, Kruzel ML, Wildt S. Recombinant human lactoferrin expressed in glycoengineered Pichia pastoris: effect of terminal N-acetylneuraminic acid on in vitro secondary humoral immune response. *Glycoconj J*, 2008, 25, 581-93.

15. Chowers YJ, Kirschner N, Keller I, Barshack S, Bar-Meir S, Ashkenazi R. Schneerson J, Robbins JH. O-specific polysaccharide conjugate vaccine-induced antibodies prevent invasion of Shigella into Caco-2 cells and may be curative. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 2396-2401.

16. Chuang YJ, Swanson R, Raja SM, Olson ST. Heparin enhances the specificity of antithrombin for thrombin and factor Xa independent of the reactive center loop sequence. Evidence for an exosite determinant of factor Xa specificity in heparin-activated antithrombin. *J Biol Chem*, 2001, 276, 14961-71.

17. Cohen DS, Ashkenazi MS, Green M, Gdalevich G, Robin R, Slepon M, Yavzori N. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational Shigella sonnei conjugate vaccine in young adults. *Lancet*, 1997, 349, 155-159.

18. Cooper GM, Hausman RE. Stanica- molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 367.

19. Corey L, Spear PG. Infections with herpes simplex viruses (1). *N Engl J Med*, 1986 314, 686-91.

20. Dennis JW, Nabi IR, Demetriou M. Metabolism, Cell Surface Organization, and Diseases. *Cell*, 2009, 139, 1229–1241

.

21. Dochez AR, Avery OT. The elaboration of specific soluble substance by pneumococcus during growth. *J Exp Med*, 1917, 26, 477-93.

22. Doores KJ, Fulton Z, Hong V, Patel MK, Scanlan CN, Wormald MR, Finn MG, Burton DR, Wilson IA, Davis BG. A nonself sugar mimic of the HIV glycan shield shows enhanced antigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107, 17107-12.

23. Dwyer JM. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J Med*, 1992, 326, 107-16

24. Earl PL, Doms RW, Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87, 648–652.

25. Elliott S, Lorenzini T, Asher S, Aoki K, Brankow D, Buck L, Busse L, Chang D, Fuller J, Grant J, Hernday N, Hokum M, Hu S, Knudten A, Levin N, Komorowski R, Martin F, Navarro R, Osslund T, Rogers G, Rogers N, Trail G, Egrie J. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol*, 2003, 21, 414-21.

26. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen L, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100, 6741-6.

27. Ernst B, Magnani JL. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Chem Biol*, 2014, 21, 16-37.

28. Esparza JA. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine*, 2013, 31, 3502–3518.

29. Fihn SD. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. *N Engl J Med*, 2003, 349, 259–266.

30. Filbin MT. Myelin‐associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nature Rev Neurosci*, 2003, 4, 703–713.

31. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC‐SIGN,a novel dendritic cell‐specific ICAM‐3 receptor thatsupports primary immune responses. *Cell*, 2000, 100, 575–585.

32. Gening ML, Maira-Litrán T, Kropec A, Skurnik D, Grout M, Tsvetkov YE, Nifantiev NE, Pier GB Synthetic {beta}-(1-;6)-linked N-acetylated and nonacetylated oligoglucosamines used to produce conjugate vaccines for bacterial pathogens. *Infect Immun*, 2010, 78, 764-72.

33. Gurney KB, Elliott J, Nassanian H, Song C, Soilleux E, McGowan I, Anton PA, Lee B. Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DCSIGN+ cells in human rectal mucosa. *J Virol*, 2005, 79, 5762-73.

34. Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, Jiang Y, Rios S, Bobrowicz P, Stadheim TA, Li H, Choi BK, Hopkins D, Wischnewski H, Roser J, Mitchell T, Strawbridge RR, Hoopes J, Wildt S, Gerngross TU. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 2006, 313, 1441-3.

35. Heidelberger M, DilapiI MM, Siegel M, Walter AW. Persistence of antibodies in human subjects injected with pneumococcal polysaccharides. *J Immunol*, 1950, 65, 535-41.

36. Hoffmann-Roder A, Kaiser A, Wagner S, Gaidzik N, Kowalczyk D, Westerlind U, Gerlitzki B, Schitt E, Kunz H. Synthetic antitumor vaccines from tetanus toxoid conjugates of MUC1 glycopeptides with the Thomsen-Friedenreich antigen and a fluorine substituted analogue. *Angew Chem*, 2010, 49, 8498−8503.

37. Horiya S, MacPherson IS, Krauss IJ. Recent strategies targeting HIV glycans in vaccine design. *Nat Chem Biol*, 2014, 10, 990-9.

38. Huang W, Giddens J, Fan SQ, Toonstra C, Wang LX. Chemoenzymatic glycoengineering of intact IgG antibodies for gain of functions. *J Am Chem Soc*, 2012, 134, 12308-18.

39. Hudak JE, Bertozzi CR. Glycotherapy: new advances inspire a reemergence of glycans in medicine. *Infect Drug Resist*, 2013, 6, 187–198.

40. Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Qiu WT, Huang C, Sharpe AH, Stevens RL. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature*, 1999, 400, 769-72.

41. Ingale S, Wolfert MA, Buskas T, Boons GJ. Increasing the antigenicity of synthetic tumor-associated carbohydrate antigens by targeting toll-like receptors. *ChemBioChem*, 2009, 10, 455−463.

42. Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics.*Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8, 226-34.

43. Ju T, Lanneau GS, Gautam T, Wang Y, Xia B, Stowell SR, Willard MT, Wang W, Xia JY, Zuna RE, Laszik Z, Benbrook DM, Hanigan MH, Cummings RD. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res*, 2008, 68, 1636-46.

44. Kalra S. Alpha glucosidase inhibitors. *J Pak Med Assoc*, 2014, 64, 474-6.

45. Kamali A, Holodniy M.
Influenza treatment and prophylaxis with neuraminidase inhibitors: a review. *Infect Drug Resist*, 2013, 6, 187-98.

46. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, McDonald JU, Orr SJ, Berger M, Petzold D, Blanchard V, Winkler A, Hess C, Reid DM, Majoul IV, Strait RT, Harris NL, Köhl G, Wex E, Ludwig R, Zillikens D, Nimmerjahn F, Finkelman FD, Brown GD, Ehlers M, Köhl J. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat Med*, 2012, 18, 1401-6.

47. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch G. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 2006, 313, 670-3.

48. Kim JH, Resende R, Wennekes T, Chen HM, Bance N, Buchini S, Watts AG, Pilling P, Streltsov VA, Petric M, Liggins R, Barrett S, McKimm-Breschkin JL, Niikura M, Withers SG. Mechanism-based covalent neuraminidase inhibitors with broad-spectrum influenza antiviral activity. *Science*, 2013, 340, 71-5.

49. Kitov PI, Mulvey GL, Griener TP, Lipinski T, Solomon D, Paszkiewicz E, Jacobson JM, Sadowska JM, Suzuki M, Yamamura K, Armstrong GD, Bundle DR. In vivo supramolecular templating enhances the activity of multivalent ligands: a potential therapeutic against the Escherichia coli O157 AB5 toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 16837-42.

50. Kitov PI, Sadowska JM, Mulvey G, Armstrong GD, Ling H, Pannu NS, Read RJ, Bundle DR. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature*, 2000, 403, 669-72.

51. Lakshminarayanan V, Thompson P, Wolfert MA, Buskas T, Bradley JM, Pathangey LB, Madsen CS, Cohen PA, Gendler SJ, Boons GJ. Immune recognition of tumor-associated mucin MUC1 is achieved by a fully synthetic aberrantly glycosylated MUC1tripartite vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109, 261−266.

52. Lasala F, Arce E, Otero JR, Rojo J, Delgado R. Mannosyl glycodendritic structure inhibits DC‐SIGN‐mediated ebola virus infections in cis and intrans. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47, 3970–3972.

53. Lipinski T, Kitov PI, Szpacenko A, Paszkiewicz E, Bundle DR. Synthesis and immunogenicity of a glycopolymer conjugate. *Bioconjug Chem*, 2011, 22, 274-81.

54. Lucas AH, Apicella MA, Taylor CE. Carbohydrate moieties as vaccine candidates. *Clin Infect Dis*, 2005, 41, 705-12.

55. Magnani JL, Patton JT, Sarkar AK. 2012. U.S. Patent 7,517,980.

56. Marth JD. A unified vision of the building blocks of life. *Nat Cell Biol*, 2008, 10, 1015-6.

57. Nativi C, Renaudet O. Recent progress in antitumoral synthetic vaccines. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5, 1176-8.

58. Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti‐adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 38, 181–190.

59. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, 126, 855-67.

60. Okeley NM, Alley SC, Anderson ME, Boursalian TE, Burke PJ, Emmerton KM, Jeffrey SC, Klussman K, Law CL, Sussman D, Toki BE, Westendorf L, Zeng W, Zhang X, Benjamin DR, Senter PD. Development of orally active inhibitors of protein and cellular fucosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110, 5404-9.

61. Palmer LM, Reilly TJ, Utsalo SJ, Donnenberg MS. Internalization of Escherichia coliby human renal epithelial cells is associated with tyrosine phosphorylation of specific host cell proteins. *Infect. Immun*, 1997, 65, 2570–2575.

62. Papadopoulos S, Flynn JD, Lewis DA. Fondaparinux as a Treatment Option for Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Pharmacotherapy*, 2007, 27, 921-926.

63. Pastores GM. Recombinant glucocerebrosidase (imiglucerase) as a therapy for Gaucher disease. *BioDrugs*, 2010, 24, 41-7.

64. Patrie SM, Roth MJ, Kohler JJ. Introduction to glycosylation and mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 2013, 951, 1-17.

65. Perlman S, van den Hazel B, Christiansen J, Gram-Nielsen S, Jeppesen CB, Andersen KV, Halkier T, Okkels S, Schambye HT. Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in vivo activity of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 3227-35.

66. Phalipon A, Tanguy M, Grandjean C, Guerreiro C, Bélot F, Cohen D, Sansonetti PJ, Mulard LA. A synthetic carbohydrate-protein conjugate vaccine candidate against Shigella flexneri 2a infection. *J Immunol*, 2009, 182, 2241-7.

67. Platt FM, Jeyakumar M. Substrate reduction therapy. *Acta Paediatr Suppl*, 2008, 97, 88-93.

68. Prescher JA, Dube DH, Bertozzi CR. Chemical remodeling of cell surfaces in living animals, *Nature*, 2004, 430, 873–877.

69. Pukin AV, Branderhorst HM, Sisu C, Weijers CA, Gilbert M, Liskamp RM, Visser GM, Zuilhof H, Pieters RJ. Strong inhibition of cholera toxin by multivalent GM1 derivatives. *Chembiochem*, 2007, 8, 1500-3.

70. Rappocciolo G, Jenkins FJ, Hensler HR, Piazza P, Jais M, Borowski L, Watkins SC, Rinaldo CR. DC-SIGN is
a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages.
JImmunol, 2006, 176, 1741-9.

71. Rele SM, Cui W, Wang L, Hou S, Barr-Zarse G, Tatton D, Gnanou Y, Esko JD, Chaikof EL. Dendrimer-like PEO glycopolymers exhibit anti-inflammatory properties. *J Am Chem Soc*, 2005, 127, 10132-3.

72. Renaudet O, Dasgupta G, Bettahi I, Shi A, Nesburn AB, Dumy P, BenMohamed L. Linear and branched glyco-lipopeptides vaccines follow distinct cross-presentation pathways and generate different magnitudes of antitumor immunity. *PLoS One*, 2010, 5, 1121-6.

73. Ribeiro-Viana R, Sánchez-Navarro M, Luczkowiak J, Koeppe JR, Delgado R, Rojo J, Davis BG. Virus-like glycodendrinanoparticles displaying quasi-equivalent nested polyvalency upon glycoprotein platforms potently block viral infection. *Nat Commun*, 2012, 3, 1300-3.

74. Richichi B, Thomas B, Fiore M, Bosco R, Qureshi H, Nativi C, Renaudet O, BenMohamed LA. Cancer therapeutic vaccine based on clustered Tn-antigen mimetics

induces strong antibody-mediated protective immunity. *Angew. Chem*, 2014, 53, 11917-20.

75. Robbins JB, Chu R. Hypothesis for vaccine development: protective immunity to enteric diseases caused by nontyphoidal *S*almonellae and *S*higellae may be conferred by serum IgG antibodies to the O-specific polysaccharide of their lipopolysaccharides. *Clin Infect Dis*, 1992, 15, 346-361.

76. Robbins JB, Schneerson R, Anderson P, Smith DH. Prevention of systemic infections, especially meningitis, caused by Haemophilus influenzae type b: impact on public healthand implication for other polysaccharide-based vaccines. *JAMA*, 1996, 276, 1181-5.

77. Samson M, Pizzorno A, Abed Y, Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res*, 2013, 98, 174–185.

78. Sato M, Furuike T, Sadamoto R, Fujitani N, Nakahara T, Niikura K, Monde K, Kondo H, Nishimura S. Glycoinsulins: dendritic sialyloligosaccharide-displaying insulins showing a prolonged blood-sugar-lowering activity. *J Am Chem Soc*, 2004, 126, 14013-22.

79. Satoh M, Iida S, Shitara K. Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert Opin Biol Ther*, 2006, 6, 1161-73.

80. Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*, 2002, 418, 785-9.

81. Seeberger PH, Werz DB. Synthesis and medical applications of oligosaccharides. *Nature*, 2007, 446, 1046-51.

82. Shukla D, Spear PG. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest*, 2001, 108, 503–510.

83. Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med*, 2006, 12, 75-80.

84. Štimac D, Mikolašević I. Gaucherova bolest – gastroenterološki pristup. *Medix*, 2013, 19, 107-108.

85. Tamborrini M, Werz DB, Frey J, Pluschke G, Seeberger PH. Anti-carbohydrate antibodies for the detection of anthrax spores. *Angew Chem*, 2006, 45, 6581-2.

86. Tappero JW, Lagos R, Perkins BA. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines. *JAMA*, 1999, 291, 1520-27.

87. van Die I, Cummings RD. Glycans modulate immune responses in helminthinfections and allergy. *Chem Immunol Allergy*, 2006, 90, 91–112.

88. van Kasteren SI, Campbell SJ, Serres S, Anthony DC, Sibson NR, Davis BG. Glyconanoparticles allow pre-symptomatic in vivo imaging of brain disease. *Proc Natl Acad Sci U S* , 2009, 106, 18-23.

89. van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 2008, 9, 593-601.

90. Verez-Bencomo V, Fernández-Santana V, Hardy E, Toledo ME, Rodríguez MC, Heynngnezz L, Rodriguez A, Baly A, Herrera L, Izquierdo M. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against Haemophilus influenzae. *Science*, 2004, 305, 522–525.

91. Wang SK, Liang PH, Astronomo RD, Hsu TL, Hsieh SL, Burton DR, Wong CH. Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 3690-5.

92. Wilkinson BL, Day S, Malins LR, Apostolopoulos V, Payne RJ. Self-adjuvating multicomponent cancer vaccine candidates combining per-glycosylated MUC1 glycopeptides and the Toll-like receptor 2 agonist Pam3CysSer. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50, 1635−1639.

93. Wilson RM, Danishefsky SJ. A vision for vaccines built from fully synthetic tumor-associated antigens: from the laboratory to the clinic. *J Am Chem Soc*, 2013, 135, 14462−14472.

94. Witte K, Sears P, Martin R, Wong CH. Enzymatic glycoprotein synthesis: Preparation of ribonuclease glycoforms via enzymatic glycopeptide condensation and glycosylation. *J Am Chem Soc*, 1997, 119, 2114–2118.

95. Xin H, Dziadek S, Bundle DR, Cutler JE. Synthetic glycopeptide vaccines combining beta-mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 13526-31.

96. Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, Vocadlo DJ. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat Chem Biol*, 2012, 8, 393-9.

97. Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, Vocadlo DJ. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol*, 2008, 4, 483-90.

98. Zhu J, Wan Q, Lee D, Yang G, Spassova MK, Ouerfelli O, Ragupathi G, Damani P, Livingston PO, Danishefsky SJ. From synthesis to biologics: preclinical data on a chemistry derived anticancer vaccine. *J Am Chem Soc*, 2009, 131, 9298−9303.

7. SAŽETAK/SUMMARY

a. Sažetak

Glikani su najrašireniji biopolimeri. Osim njihove uloge u metabolizmu, osnovne su sastavnice staničnih površina gdje su uključeni u vitalne stanične procese prepoznavanja.

Zbog specifičnih interakcija s fiziološkim receptorima sudjeluju u mnogim biološkim procesima. Svi ti procesi su potencijalne mete terapeutskih intervencija.

Početak dvadesetog stoljeća obilježen je začetkom moderne medicine na čelu s terapijama baziranima na glikanima. Međutim, glikani su vrlo brzo postali zasjenjeni lakom dostupnošću terapija baziranih na DNA i proteinskim molekulama. Nedavni razvoj različitih alata i tehnika za analizu i sintezu strukturno složenih ugljikohidrata, ponovo je potaknuo interes terapeutske primjene glikana. Trenutno je mnogo glikanskih spojeva u različitim stadijima kliničkih ispitivanja.

Ovaj diplomski rad je usmjeren na glikane kao farmaceutske mete, naglašava ulogu odobrenih glikanskih terapeutika te razmatra potencijal proteina koji mogu vezati ugljikohidrate. Rad također pruža uvid u cjepiva bazirana na ugljikohidratima, ona već razvijena ili u fazi razvoja, s posebnim naglaskom na anti-HIV te antitumorska sintetska cjepiva. U radu je isto tako opisana i važnost glikoinženjerstva proteina koji se upotrebljavaju u terapijama (npr. eritropoetina).

b. Summary

Glycans are the most abundant natural products. Besides their role in metabolism, they are fundamental constituents of every cell surface, where they are involved in vital cellular recognition processes.

Because of their specific interactions with physiological receptors, they participate in many crucial biological processes. Therfore, there are many potential targets for therapeutic intervention.

The beginning of the 20th century marked the dawn of modern medicine with glycan-based therapies at the forefront. However, glycans quickly became overshadowed as DNA- and protein-focused treatments became readily accessible.The recent development of new tools and techniques to study and produce structurally defined carbohydrates has spurred renewed interest in the therapeutic applications of glycans. Therefore, many compounds based on carbohydrates are now in various stages of clinical trials.

This diploma thesis focuses on glycans as biopharmaceutical targets, it highlights the role of approved carbohydrate based drugs and discuss the potential of carbohydrate-binding proteins as new drug targets. It also presents carbohydrate based vaccines that have been or are being developed, with the emphasis on antitumoral sinthetic vaccines and anti-HIV vaccines, as well as glycoengineered proteins like erythropoietin.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za Biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

GLIKOZILACIJA U RAZVOJU NOVIH TERAPIJSKIH PRISTUPA

Darija Anić

SAŽETAK

Glikani su najraširenij biopolimeri. Osim njihove uloge u metabolizmu, osnovne su sastavnice staničnih površina gdje su uključeni u vitalne stanične procese prepoznavanja.

Zbog specifičnih interakcija s fiziološkim receptorima sudjeluju u mnogim biološkim procesima. Svi ti procesi su potencijalne mete terapeutskih intervencija.

Početak dvadesetog stoljeća obilježen je začetkom moderne medicine na čelu s terapijama baziranima na glikanima. Međutim, glikani su vrlo brzo postali zasjenjeni lakom dostupnošću terapija baziranih na DNA i proteinskim molekulama. Nedavni razvoj različitih alata i tehnika za analizu i sintezu strukturno složenih ugljikohidrata, ponovo je potaknuo interes terapeutske primjene glikana. Trenutno je mnogo glikanskih spojeva u različitim stadijima kliničkih ispitivanja.

Ovaj diplomski rad je usmjeren na glikane kao farmaceutske mete, naglašava ulogu odobrenih glikanskih terapeutika te razmatra potencijal proteina koji mogu vezati ugljikohidrate. Rad također pruža uvid u cjepiva bazirana na ugljikohidratima, ona već razvijena ili u fazi razvoja, s posebnim naglaskom na anti-HIV te antitumorska sintetska cjepiva. U radu je isto tako opisana i važnost glikoinženjerstva proteina koji se upotrebljavaju u terapijama (npr. eritropoetina)..

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 79 stranica, 14 grafičkih prikaza i 98 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Glikani, glikoterapija, lektini, cjepiva, glikoproteini

Mentor: **Dr. sc. Olga Gornik,** *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Lidija Bach Rojecky, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Suzana Inić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2015.

Basic documetation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Biochemistry and molecular biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

GLYCOSYLATION IN DEVELOPMENT OF NEW THERAPEUTIC APPROACHES

Darija Anić

SUMMARY

Glycans are the most abundant natural products. Besides their role in metabolism, they are fundamental constituents of every cell surface, where they are involved in vital cellular recognition processes.

Because of their specific interactions with physiological receptors, they participate in many crucial biological processes. Therfore, there are many potential targets for therapeutic intervention.

The beginning of the 20th century marked the dawn of modern medicine with glycan-based therapies at the forefront. However, glycans quickly became overshadowed as DNA- and protein-focused treatments became readily accessible. The recent development of new tools and techniques to study and produce structurally defined carbohydrates has spurred renewed interest in the therapeutic applications of glycans. Therefore, many compounds based on carbohydrates are now in various stages of clinical trials.

This diploma thesis focuses on glycans as biopharmaceutical targets, it highlights the role of approved carbohydrate based drugs and discuss the potential of carbohydrate-binding proteins as new drug targets. It also presents carbohydrate based vaccines that have been or are being developed, with the emphasis on antitumoral sinthetic vaccines and anti-HIV vaccines, as well as glycoengineered proteins like erythropoietin.

The thesis is deposited in the Croatia Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Thesis includes: 79 pages, 14 figures and 98 references. Original is in Croatian language.

Key words: Glycans, glycotherapy, lectins, vaccines, glycoproteins

Mentor: **Olga Gornik, Ph.D.** *Assistant Professor*, *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Olga Gornik, Ph.D.** *Assistant Professor*, *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Suzana Inić, Ph.D. *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

This thesis was accepted: June 2015.