

# Terapijski enzimi mikrobnog podrijetla

---

**Miše, Toni Slavko**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:245310>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Biotehnologija**

**Toni Slavko Miše  
0058217365**

## **Terapijski enzimi mikrobnog podrijetla**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Biotehnologija 4**

**Mentor: prof. dr. sc. Blaženka Kos**

**Zagreb, 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Terapijski enzimi mikrobnog podrijetla

Toni Slavko Miše, 0058217365

**Sažetak:** Biofarmaceutika je brzo rastuće područje unutar kojeg se provode istraživanja i koriste stanične linije, mikroorganizmi i njihovi proizvodi za terapijsku primjenu. Enzimi su izvanredni biokatalizatori koji ubrzavaju biokemijske reakcije. Posjeduju nekoliko specifičnih značajki kao što su velik katalitički potencijal, velika specifičnost za supstrat, kao i pH i temperaturni optimumi njihove katalitičke aktivnosti. Zbog ovih izvanrednih svojstava pronalaze različite kliničke primjene i sve se više koriste za liječenje širokog spektra bolesti, samostalno ili u kombinaciji s drugim terapijama, te čine važnu podskupinu modernih biofarmaceutika. Terapijska primjena enzima uključuje protuupalne agense, enzibiotike, fibrinolitičke agense, agense protiv tumora, probavne terapijske enzime, kao i enzime za rijetke bolesti. Razvoj novih terapijskih enzima kao i nadogradnja i poboljšanja postojećih primjenom proteinskog inženjerstva su prioritet. Izolaciju, regulaciju, proizvodnju i primjenu enzima kao biofarmaceutika treba unaprijediti do maksimalnog potencijala kako bi se iskoristile njihove prednosti u odnosu na kemijska terapijska sredstva u liječenju različitih bolesti.

**Ključne riječi:** enzimi, terapijski učinci, biofarmaceutika, medicinska primjena

**Rad sadrži:** 29 stranica, 11 slika, 2 tablica, 12 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Datum obrane:** 08. srpnja 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Biotechnology

Department of Biochemical engineering  
Laboratory for Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Therapeutic enzymes of microbial origin**

**Toni Slavko Miše, 0058217365**

**Abstract:** Biopharmaceuticals is a fast emerging field that explores and employs biological organisms and their products for therapeutic applications. Enzymes are biocatalysts that accelerate the rate of biochemical reactions. They possess features like catalytic potential, substrate specificity as well as pH and temperature optima. Due to these attributes, they find diverse clinical applications, and are increasingly used to treat a wide range of diseases, alone or in combination with other therapies, so they are important subclass of biopharmaceuticals. Therapeutic applications of enzymes include anti-inflammatory agents, enzymotics, fibrinolytic agents, anticancer agents, digestive therapeutic enzymes, as well as enzymes for rare diseases. Development of new therapeutic enzymes as well as upgrading and improving existing ones using protein engineering are a priority. The isolation, regulation, production and application of microbial enzymes as biopharmaceuticals should be improved to the maximum potential in order to utilize their advantages over chemical therapeutic agents in the treatment of various diseases.

**Keywords:** enzymes, clinical applications, biopharmacy, medical use

**Thesis contains:** 29 pages, 11 figures, 2 tables, 12 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Blaženka Kos, PhD Full Professor

**Thesis defended:** July 08, 2022

## Sadržaj

1.UVOD .....	1
2.ENZIMI ZA LIJEČENJE KARDIOVASKULARNIH BOLESTI .....	2
2.1.TKIVNI AKTIVATOR PLAZMINOGENA .....	2
2.2.URINOKINAZA PLAZMINOGEN AKTIVATOR.....	3
2.3.STREPTOKINAZA .....	4
2.4.AUREOLIZIN .....	5
2.5.NATTOKINAZA .....	6
3.ENZIMI ZA LIJEČENJE TUMORA .....	6
3.1.L-ASPARGINAZA .....	7
3.2.ARGININ DEAMINAZA .....	8
3.3.METIONAZA.....	9
3.4.RIBONUKLEAZE I OSTALI ANTITUMORSKI ENZIMI .....	10
4.PROTUUPALNI ENZIMI .....	12
4.1.SERRATIOPEPTIDAZA.....	12
4.2.SUPEROKSID DISMUTAZA.....	14
4.3.KOLAGENAZE .....	15
5.PROBAVNI ENZIMI.....	16
5.1.B-GALAKTOZIDAZA .....	16
5.2.ENZIMI GUŠTERAČE ZA MALAPSORPCIJU .....	17
5.2.1. AMILAZE.....	18

5.2.2. LIPAZE .....	18
5.3.GLUTENAZE.....	19
6.ANTIMIKROBNI ENZIMI (ENZIBIOTICI) .....	20
6.1.LIZINI.....	20
6.2.LIZOZIMI.....	21
6.3.BAKTERIOCINI .....	22
7.TERAPIJSKI ENZIMI ZA RIJETKE BOLESTI .....	24
7.1.CERLIPONAZA ALFA .....	24
7.2.ALGLUKOZIDAZA ALFA.....	25
7.3.GALSULFAZA.....	26
7.4.ELOSULFAZA ALFA .....	26
7.5.SAKROZIDAZA .....	26
7.6.B-GLUKOCEREBROZIDAZA .....	27
8.ZAKLJUČCI.....	28
9.POPIS LITERATURE .....	28

## 1. UVOD

Enzimi su funkcionalni proteini ili nukleinske kiseline (ribozimi), također poznati kao biokatalizatori koji snižavaju energiju aktivacije biokemijskih reakcija te se one odvijaju brzinama koje su prikladne za normalno funkcioniranje, rast, proliferaciju svih živih stanica, uključujući jednostanične i višestanične organizme (Meghwanshi i sur., 2020). Sadrže nekoliko izvanrednih značajki kao veliki katalitički potencijal, specifičnost za supstrat te široki pH i temperaturni optimum. Funkcionalni enzimi mogu se izolirati iz biljaka, životinja ili mikroorganizama. Enzimi izvorno izolirani iz mikroba nude različite prednosti, uključujući jednostavnost izolacije, visoku konzistenciju, veće prinose, ekonomsku izvedivost, stabilnost i izravnu proizvodnju putem tehnologije rekombinantne DNA koristeći mikrobe kao stanice domaćina i radne mikroorganizme. Prednost koja se pripisuje proizvodnji mikrobnih enzima je visok prinos na jeftinom mediju u kratkom vremenskom razdoblju. Osim toga, nekoliko pristupa poput fuzijskih proteina, PEGilacije, točkastih mutacija, inkapsulacija nanonosaićima i druge metode genetićke manipulacije mogu se dalje koristiti za poboljšanje učinkovitosti i dobivanje neprekinute standardne linije enzima. Zbog navedenih izvanrednih svojstava, enzimi pronalaze različite klinićeke primjene. Sve se više koriste za lijećenje širokog spektra bolesti, primjenjujući se samostalno ili u kombinaciji s drugim lijekovima. Identifikacija i razvoj terapijskih agenasa za suzbijanje bolesti desetljećima primarni je fokus istraživanja. Posljednji napreci na području biotehnologije proširili su perspektivu enzima kao biofarmaceutika (Vachher i sur., 2021). Glavni predstavnici uključuju proteaze, esteraze i nukleaze. Klinićeke učinkovitost ovih enzima obićno prednjaći zbog poboljšane katalitićke aktivnosti i farmakokinetike, kao i smanjene imunogenost. Prepoznajući ogroman potencijal i vrijednost ovih biomakromolekula, naporni znanstvenika i inženjera da iskoriste izvanredne ućinke za proizvodnju medicinskih, industrijskih i proizvoda datiraju više od sto godina (Alcalde, 2017). Cilj ovog završnog rada bio je dati pregled terapijskih enzima s obzirom na tip bolesti koje lijeće.

## 2. Enzimi za liječenje kardiovaskularnih bolesti

Fibrin je glavni protein koji nastaje tijekom zacjeljenja rana i krajnji je proizvod kaskade zgrušavanja krvi. Sprječava gubitak krvi tijekom ozljeda. Enzim poput plazmina izravno razgrađuje fibrin. Za normalno funkcioniranje sustava potrebna je ravnoteža između stvaranja i uklanjanja fibrina. Međutim, kada se ravnoteža pomakne prema nepravilnom nakupljanju fibrina, javljaju se trombolitičke bolesti kao što su akutni infarkt miokarda i moždani udar. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, 31 % smrtnosti u cijelom svijetu u 2012. bilo je uzrokovano kardiovaskularnim bolestima (Sugathan i sur., 2017). Mikrobni fibrinolitički enzimi su proteaze, koje pokazuju sposobnost učinkovite razgradnje krvnih ugrušaka bez nuspojava, obnavljajući normalan protok krvi u krvnim žilama (Vachher i sur., 2021). Na temelju mehanizma djelovanja dijele se na dvije vrste, tj. aktivatori plazminogena (npr. tkivni tip aktivator plazminogena (tPA) i urokinaza) i enzimi slični plazminu (npr. nattokinaza i lumbrokinaza). Iako ovi enzimi mogu učinkovito razgraditi krvne ugruške, oni imaju različite mehanizme kao i selektivnost za fibrinske ugruške (Sugathan i sur., 2017).

### 2.1. Tkivni aktivator plazminogena

Aktivator tkivnog plazminogena (tPA, EC 3.4.21.68) serinska je proteaze koja pretvara plazminogen u plazmin i tako pomaže u razgradnji ugruška. Tkivni aktivator plazminogena sastoji se od 527 aminokiselina s molekulskom masom od 70 kDa. Obično se nalaze u endotelnim stanicama i pomaže u obnavljanju protoka krvi nakon formiranja tromba. Zbog svoje sposobnosti razgradnje krvnih ugrušaka, koristi se kao trombolitički lijek za liječenje miokarda, cerebrovaskularnog trombotičkog moždanog udara i plućne embolije. U određenim fiziološkim uvjetima do fibrinolize možda neće doći jer su aktivatori plazminogena kao i plazmin inhibirani cirkulirajućim inhibitorima aktivatora plazminogena i inhibitorima  $\alpha_2$  plazmina. Međutim, terapijska primjena enzima aktivatora plazminogena može prevladati učinak, što dovodi do trombolize. Slobodni tPA je bio u stanju lizirati plućne ugruške koji su se zadržali prije primjene, ali ne i one koji su zaostali nakon injekcije. Eritrocitno konjugirani tPA, međutim, bio je selektivniji u liziranju početnog naspram već postojeg plućnog embolija i arterijskog ugruška što je učinak koji je najvjerojatnije rezultat ograničavanja difuzije tPA u fibrin (Bax, 2020). Na slici 1 prikazana je struktura plazminogena (Sugathan i sur., 2017).



Mikroorganizam poput *E. coli* najčešće se koristi za proizvodnju rekombinantnog tPA ili rtPA, zbog brzog rasta te jednostavne genetske manipulacije i dostupnosti raznih sojeva (Vachher i sur., 2021). Rekombinantni tkivni aktivatori plazminogena (rtPA) dostupni su za terapijsku upotrebu pod nazivom lijekova alteplaza, reteplaza i tenekteplaza (Sugathan i sur., 2017).



**Slika 1.** Kristalna struktura aktivatora plazminogena tkivnog tipa u kompleksu s inhibitorom aktivatora plazminogena-1. Aktivator plazminogena tkivnog tipa prikazan je zelenom bojom, a inhibitor aktivatora plazminogena-1 plavom bojom (Sugathan i sur., 2017)

## 2.2. Urinokinaza plazminogen aktivator

Iz urina je izoliran enzim urinokinaza (UK, EC 3.4.21.31) molekularne težine 54 kDa koja pretvara plazminogen u plazmin dok se nalazi unutar tromba i tako ga čini zaštićenim od cirkulirajućih antiplazmina. Urinokinaza je serinska proteaza i heterodimer s polipeptidnim lancima od 20 kDa i 34 kDa. Na slici 2 prikazana je struktura urinokinaze. Urinokinaza može razbiti krvne ugruške jer njegova proteolitička aktivnost cijepa zimogen plazminogen u aktivni plazmin serin proteaze. Aktivni plazmin zatim cijepa fibrin, vlaknasti protein koji je ključan za stvaranje krvnih ugrušaka, na kraju otapajući ugrušak. Izlučuje se kao prekursorska molekula prourinokinaze, koja je jednolančana i može se aktivirati u dvolančanu urinokinazu pomoću

plazmina ili kalikreina. Prourinokinaza (pro-UK) je učinkovita oko 24 sata nakon primjene, dok se urinokinaza inaktivira unutar nekoliko sati. Nakon intravenske primjene, prourinokinaza postiže potpunu fibrinolizu unutar 1,5 h dok urinokinazi treba 3 h za lizu. Prourinokinaza (pro-UK) ima prednost u odnosu na urinokinazu zbog svoje poboljšane selektivnosti prema fibrinu i boljeg poluživota u odnosu na potonju (Zamarron i sur., 1984). Rekombinantna prourinokinaza može se proizvesti u *E. coli* ili u stanicama sisavaca (Sugathan i sur., 2017).



**Slika 2.** Kristalna struktura urokinaze aktivator plazminogena (Sugathan i sur., 2017)

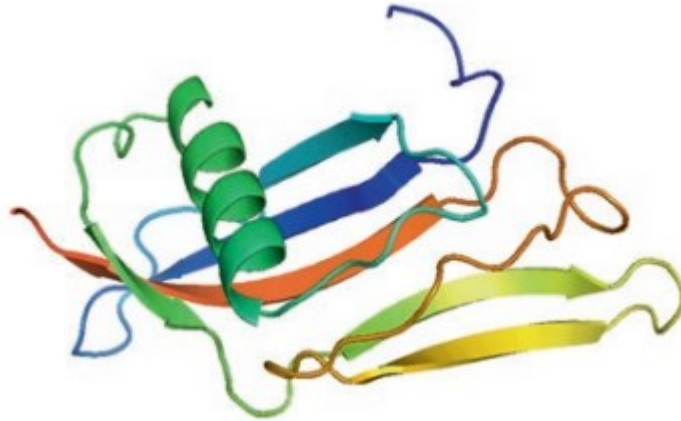
### 2.3. Streptokinaza

Streptokinaza (SK, EC 3.4.99.0) je mikrobnii aktivator plazminogena kojeg proizvode različiti sojevi  $\beta$ -hemolitičkih streptokoka. To je jednolančani polipeptid molekulske mase 47 kDa. Protein streptokinaza veže se na plazminogen i pretvara ga u fibrinolitički plazmin (Sugathan i sur., 2017). Streptokinaza je sposobna razgraditi krvne ugruške tako da se mogu ukloniti s mjesta rane, gdje je krvni ugrušak prvobitno nastao (Meghwanshi i sur., 2020). Streptokinaza ima bolji poluživot od 18 min u usporedbi s tkivnim aktivatorom plazminogena (tPA). Streptokinaza izaziva antigene reakcije kao što su hipotenzija i anafilaktičke reakcije (Sugathan i sur., 2017). Mikroorganizam poput *E. coli* najčešće se koristi za proizvodnju rekombinantnog

tPA ili rtPA, zbog svog brzog rasta, lakoće genetske manipulacije i dostupnosti mnogih sojeva i vektora domaćina. *Pichia pastoris*, metilotrofni kvasac, također se smatra odgovarajućom alternativom za eukariotske i prokariotske ekspresijske sustave za proizvodnju rtPA. tPA je bio prvi sintetski lijek proizveden u staničnim linijama jajnika kineskog hrčka (CHO) za farmaceutsku upotrebu (Vachher i sur., 2021).

#### **2.4. Aureolizin**

Aureolizin (EC 3.4.24.29; nekadašnji naziv stafilokinaza, SAK, EC 3.4.99.22) je izvanstanični protein koji luči većina sojeva *Staphylococcus aureus*. To je aktivator tkivnog plazminogena (tPA) i tvori kompleks s plazminogenom kako bi tvorio plazmin. SAK je monomer od 136 aminokiselina bez disulfidnih mostova. Struktura je prikazana na slici 3. Rekombinantna stafilokinaza pokazala je veću fibrinolitičku aktivnost od fibrinolitičke aktivnosti u usporedbi sa streptokinazom, a popularno je poznat kao stafilokokni fibrinolizin ili Müllerov faktor. Prirodna stafilokinaza koju proizvodi *Staphylococcus aureus* pokazuje visoku imunogenost i niže prinose (Vachher i sur., 2021). Kako bi se prevladala ova ograničenja, proizvode se rekombinantne stafilokinaze s većim prinosima, pojačanom fibrinolitičkom aktivnošću i nižom imunogenošću. Koristeći tehnologiju rekombinantne DNA i proteinski inženjering, razvijen je niz ekspresijskih sustava za proizvodnju konstruiranih rekombinantnih molekula stafilokinaze, koje pokazuju pojačanu fibrinolitičku aktivnost i smanjenu antigenost. Klinička ispitivanja u pilot mjerilu pokazala su potencijal stafilokinaze kao fibrinolitičkog enzima. Slična je streptokinazi po svojoj trombolitičkoj aktivnosti. Poput streptokinaze, stafilokinaza tvori stehiometrijski kompleks 1:1 zajedno s plazminom ili plazminogenom kako bi stimulirala druge molekule plazminogena, što konačno dovodi do razgradnje krvnih ugrušaka (Sugathan i sur., 2017).



**Slika 3.** Kristalografska struktura stafilokinaze određena pod 1.8 Å (Sugathan i sur., 2017)

## 2.5. Nattokinaza

Nattokinaza (poznata i pod nazivom subtilisin NAT, EC 3.4. 21.62) je polipeptidni lanac od 275 aminokiselina, veličine je 27,7 kDa. Optimalni pH kreće se od 6 do 12, a aktivnost opada na temperaturi iznad 60 °C. Nattokinaza je treća generacija fibrinolitičkih enzima ekstrahirana i pročišćena iz japanskog fermentiranog prehrambenog proizvoda od soje, nazvanog natto, koji uključuje bakteriju *Bacillus natto*. Nattokinaza je serinska proteaza koja pripada obitelji subtilizina i nije kinaza, unatoč svom nazivu. Kada je u kontaktu s krvlju ili krvnim ugrušcima, pokazuje snažno fibrinolitičko djelovanje i pokazalo se da inaktivira inhibitor aktivatora plazminogena-I. Nattokinaza koja pokazuje maksimalnu stabilnost, ekonomsku izvedivost i učinkovitu fibrinolitičku aktivnost i dalje se dobiva iz *B. subtilis* (Vachher i sur., 2021).

## 3. Enzimi za liječenje tumora

Mikrobni enzimi nalaze različite primjene kao antikancerogeni lijekovi. Na globalnoj razini, rak se pojavio kao jedan od glavnih uzroka mortaliteta i morbiditeta. Nekontrolirano širenje i

brz rast je obilježje stanica raka (Vachher i sur., 2021). Metoda deprivacije aminokiselinama tehnika je koja se koristi u terapiji protiv raka gdje se postiže iscrpljivanje, a time i indukcija gladovanja aminokiselinama u tumorskim stanicama koje su auksotrofne za određene aminokiseline (Sugathan i sur., 2017). Nadalje, tumorske stanice postaju ovisne o normalnim stanicama za opskrbu nekim hranjivim tvarima, dok naprotiv, normalne stanice pokazuju smanjene potrebe za aminokiselinama. Ova razlika u zahtjevima za aminokiselinama dovodi do metaboličke osjetljivosti stanica raka što daje razlog za terapiju iscrpljivanja aminokiselina. Enzimski terapija predlijekom koristi enzime konjugirane s protutijelima, pretvarajući predlijeke u citotoksični lijek te na taj način uništava tumorske stanice (Vachher i sur., 2021).

### 3.1. L-asparaginaza

L-asparaginaza (ASNase, EC 3.5.1.1) je jedno od najjačih terapijskih sredstava protiv akutne limfoblastične leukemije. Slika 4 prikazuje strukturu L-asparaginaze (Sugathan i sur., 2017). Enzim katalizira hidrolizu L-asparagina u aspartat i amonijak. Smanjenje limfoma opaženo je pri primjeni seruma zamorca kod miševa, a kasnije je otkriveno da je to zbog L-asparaginaze (Sugathan i sur., 2017). Asparagin je neesencijalna aminokiselina koja igra važnu ulogu u biosintezi proteina i glikoproteina, regulaciji ekspresije gena i funkcioniranju imunološkog i živčanog sustava. Normalne stanice sintetiziraju asparagin endogeno pomoću enzima asparagin sintetaze. Neke stanice raka, poput leukemijskih stanica, nemaju ili ekspresiraju vrlo niske razine asparagin sintetaze i ovise o egzogenoj opskrbi (Vachher i sur., 2021). Početkom 1970-ih, l-asparaginaza dobivena iz *E. coli* i *Erwinia Chrysantheme* uvedene su u kemoterapijski protokol za liječenje akutne limfoblastične leukemije. Međutim, njihova uporaba bila je povezana s toksičnošću jetre i gušterače. Također je uočena visoka imunogenost koja se očituje kao reakcije preosjetljivosti i/ili neutralizacije aktivnosti asparaginaze. Enzimi su imali kratko vrijeme poluživota, u rasponu od 8 do 30 sati, što zahtijeva česte infuzije (Bax, 2020). Pegilirana l-asparaginaza *E. coli* razvijena je kako bi se prevladala ova ograničenja, međutim ovi pripravak povezan je s hepatotoksičnošću, pankreatitisom i trombozom. Asparaginaza iscrpljuje tumorske stanice asparaginom, što dovodi do inhibicije mete rapamicina kod sisavaca (mTOR) što rezultira inhibicijom njegovih downstream puteva kao što su protein serin treonin kinaza (p70s6k) i 4E-vezujući protein-1 (4E-BP1), koji dodatno potiskuju translaciju, što dovodi do apoptoze tumorskih stanica (Vachher i sur., 2021).

Asparaginaza iz bakterije *Erwinia chrysanthemi* (Rylaze™ - rekombinantna-rywn), odobrena od US FDA 30. lipnja 2021., koristi se za odrasle i pedijatrijske pacijente koji su alergični na asparaginazu dobivenu iz *E. coli*, za liječenje akutne limfoblastne leukemije i limfoblastnog limfoma (US FDA, 2021).

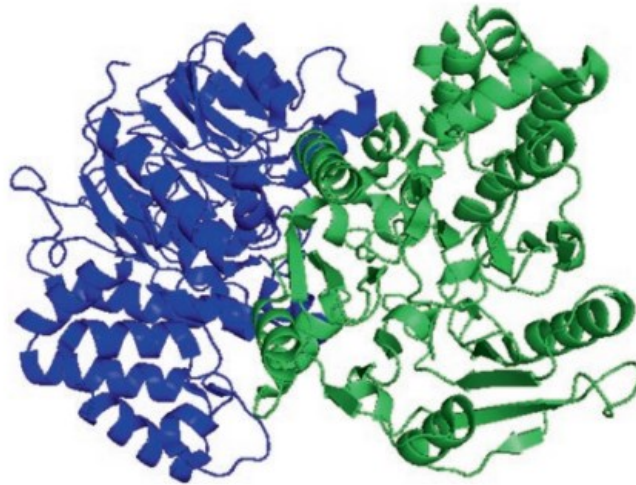


**Slika 4.** Kristalna struktura homotetramerne L-asparaginaze iz *Erwinia chrysanthemi* (pdb id: 1OJ7) (Sugathan i sur., 2017)

### 3.2. Arginin deaminaza

Arginin deiminaza (ADI, EC 3.5.3.6) je enzim koji katalizira hidroliza L-arginina u citrulin i amonijak. Slika 5 prikazuje strukturu arginin deaminaze (Sugathan i sur., 2017). Arginin je poluesencijalna aminokiselina koja igra važnu ulogu u brojnim biosintetskim putevima za dušikov oksid, proteine, poliamine, nukleotide, prolin i glutamat (Delage i sur., 2010). L-arginin se kod ljudi sintetizira pomoću enzima arginosukcinat sintetaze (ASS) i arginosukcinat liaze (ASL). Prvo, ASS katalizira pretvorbu citrulina i aspartata u argininosukcinat, zatim ASL katalizira sintezu L-arginina i fumarata iz argininosukcinata. Različiti karcinomi poput hepatocelularnog karcinoma i melanoma pokazuju auksotrofiju arginina, zbog nedostatka ili smanjene ekspresije ASS (Vachher i sur., 2021). ADI se može koristiti kao antikancerogeno terapijsko sredstvo jer može degradirati egzogenu opskrbu argininom tumorskim stanicama.

Normalne stanice mogu izbjeći ovaj mehanizam jer mogu endogeno sintetizirati arginin. Sam ADI je antigen i enzim ADI se može modificirati pričvršćivanjem polietilen glikola (PEG) (ADI-PEG 20) kako bi se smanjila antigenost i poboljšao poluživot. Utvrđeno je da je ADI-PEG20 učinkovit za hepatocelularni karcinom, maligni melanom i stanicu raka gušterače (Sugathan i sur., 2017).



**Slika 5.** Kristalografska struktura homodimera arginin deaminaze iz *Mycoplasma arginini* (pdb id: 1LXY) (Sugathan i sur., 2017)

### 3.3. Metionaza

Metioninaza ili metionin gama liaza (METase, EC 4.4.1.11), pripada obitelji enzima ovisnih o piridoksal L-fosfatu (PLP) te katalizira alfa, gama eliminaciju L-metionina, pretvarajući ga u alfa-ketobutirat, metanetiol i amonijak. L-metionin je esencijalna aminokiselina koja sadrži sumpor. Osim za sintezu proteina, metionin djeluje kao prekursor za glutation, poliamine i S-adenozil metionin (SAM). Glutation igra važnu ulogu u staničnim antioksidativnim mehanizmima, dok su poliamini neophodni za biosintezu nukleotida i diobu stanica. SAM je potreban za metilaciju DNA, RNA i proteina. Ovisnost tumorskih stanica o metioninu može biti posljedica smanjene metilacije histona, antioksidativnih mehanizama i promijenjenih epigenetskih modifikacija tumorskih stanica. Enzimsko uklanjanje metionina kod različitih karcinoma poput primarnog duktalnog karcinoma, melanoma, glioma, osteosarkoma, malog karcinoma pluća i glioblastoma uočeno je da uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa u kasnoj

S/G2 fazi. Metioninaza je prisutna u Eubacteria poput *Aeromonas sp.*, *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas putida*, *Brevibacterium linens*, kao i kod Archaeobacteria, gljiva, protista i biljaka. Dugo je vremena bila izolirana samo iz *Clostridium sporogenes*. Trenutno se koristi rekombinantna metioninaza (rMETaza) iz *Pseudomonas putida* (Pp-MGL) koja ima povoljna kinetička svojstva i izrazito je stabilna. rMETase je pokazala obećavajuće rezultate u kombiniranim terapijama protiv stanica raka, gdje se koristi s 5-fluorouracilom (5-FU) (Vachher i sur., 2021). Primjena metionin- $\gamma$ -liaze iz *Pseudomonas putida* inkapsulirane eritrocitima u miševima koji imaju izazvan humani adenokarcinom i glioblastom, bila je učinkovita u osiguravanju trajnog i značajnog smanjenja metionina u plazmi *in vivo* i smanjenju rasta tumora (Bax, 2020).

### 3.4. Ribonukleaze i ostali antitumorski enzimi

Ribonukleaze (RNaze) se istražuju kao antikancerogena sredstva više od 60 godina. Smatra se da su razlike u površinskim strukturama između normalnih i malignih stanica odgovorne za selektivni unos egzogenih RNaza i posljedično ometanje metabolizma RNA. Citotoksična svojstva enzima se postižu brзом razgradnjom RNA u ciljanim stanicama, zaustavljanjem progresije staničnog ciklusa i dovodeći do apoptoze. Do danas, terapija RNase koja je najdalje napredovala u kliničkim ispitivanjima je ranpirnaza (Onkonaza), nemodificirani enzim iz superobitelji RNase A izolirane iz žabe *Rana pipiens*. Ranpirnaza je pokazala obećavajuće rezultate kada se koristila za liječenje malignog mezotelioma u ispitivanjima faze II, ali kasnije nije uspjela u naprednim testovima. Ipak, trenutno je još pod kliničkim ispitivanjem kao mogući antivirusni lijek za liječenje humanog papiloma virusa (Sugathan i sur., 2017). Što se tiče ostalih antitumorskih enzima, vrijedno je spomenuti lizin oksidazu, L-glutaminazu i fenilalanin amonijačnu liazu. Lizin oksidaza (LO, EC 1.4.3.14) katalizira oksidativnu deaminaciju L-lizina i pretvara ga u  $\alpha$ -keto-E-aminokaproičnu kiselinu, amonijak i vodikov peroksid. Lizin je esencijalna aminokiselina i igra ulogu važnu ulogu u metilaciji, acilaciji, glikozilaciji, ubikvitinaciji i biosintezi kolagena. Njegov antikancerogeni potencijal prvi put je uočen kod gljivica, *Trichoderma viride*, a kasnije kod *Trichoderma harzianum* Rifai. Lizin oksidaza daje obećavajuće rezultate u inhibiciji mnogih različitih tumora. L-glutaminaza ili L-glutamin amido hidrolaza (EC 3.5.1.2) hidrolizira L-glutamin u glutamat i amonijak. Glutamin je neesencijalna aminokiselina i igra važnu ulogu u biosintezi DNK i proteina. Djeluje kao



primarni izvor amonijaka i igra bitnu ulogu u održavanju kiselinsko-bazne ravnoteže tjelesnih tekućina. Poznato je da stanice raka imaju petnaest puta veću potrebu za glutaminom u usporedbi s normalnim stanicama te stoga ovise o vanjskoj opskrbi glutaminom jer im nedostaje L-glutamin sintetaza. Fenilalanin amonijačna liaza (PAL, EC 4.3.1.24) pretvara fenilalanin u trans-cimetnu kiselinu i amonijak. Fenilalanin je esencijalna aminokiselina i djeluje kao prekursor tirozina, koji igra važnu ulogu u biosintezi neurotransmitera kao što su dopamin, epinefrin i norepinefrin. Pokazalo se da smanjenje fenilalanina djeluje antikancerogeno. Uloga lizin oksidaze, fenilalanin amonijačne liaze i L-glutaminaze i dalje je upitna i potrebne su daljna istraživanja prije nego što se mogu koristiti u kliničkim ispitivanjima. U tablici 1 prikazani su svi najbitniji antitumorski enzimi.

**Tablica 1.** Mikrobni enzimi s antitumorskim potencijalom (Vachher i sur., 2021)

<b>Enzim</b>	<b>Klasa</b>	<b>Mikroorganizam producent</b>	<b>Mehanizam djelovanja</b>	<b>Ciljani tumor</b>
Asparginaza	Hidrolaza	<i>E.coli, Erwinia chrysanthemi</i>	Hidroliza L-aspargina u amonijak i aspartat	Akutna limfoblastna leukemija, limfom T stanica, karcinom jajnika, limfosarkom
Arginin deaminaza	Hidrolaza	<i>Mycoplasma arginini, Mycoplasma homininis</i>	Hidroliza L-arginina u amonijak i citrulin	Hepatocelularni karcinom, melanom, mezoteliom pleure, Hodgkinov limfom, rak prostate, bubrega, dojke
Metionaza	Liaza	<i>Clostridium sporogenes, Pseudomonas putida</i>	alfa, gama eliminaciju L-metionina	Melanom, Walker 256 karcinom, gliom, karcinom bubrega, prostate, mokraćnog mjehura, debelog crijeva
Lizin oksidaza	Oksido-reduktaza	<i>Trichoderma viride</i>	Oksidativna deaminacija L-lizina	Intrakranijalni gliomi, kolorektalni karcinom, ljudi ksenografti tumora
Glutaminaza	Hidrolaza	<i>Bacillus cereus, Achromobacter sp, Aeromonas veroni</i>	Hidroliza L-glutamina u glutamat i amonijak	Hela stanice, stanice hepatocelularnog karcinoma (HepG2), Akutna limfocitna leukemija
Fenilalanin amonijačna liaza	Liaza	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Transformacija L-fenilalanina u amonijak i trans-cimetnu kiselinu	Leukemija, kolorektalni karcinom

## 4. Protuupalni enzimi

Upala je dominantni imunološki odgovor koji nastaje zbog nagle promjene stanične homeostaze, što omogućava preživljavanje tijekom infekcije, ozljede tkiva ili izloženosti kontaminantima. Tijekom akutnog upalnog odgovora, imunološke stanice migriraju na mjesto ozljede tkiva u određenom slijedu, posredovani citokinima, kemokinima i proteinima akutne faze. Poznato je da je kronična upala uključena u brojne bolesti poput artritisa, astme, ateroskleroze, autoimunih poremećaja, dijabetesa, raka i starenja. Tijekom godina, postojala su brojna istraživanja za osmišljavanje strategija za kontrolu akutnih i kroničnih upalnih odgovora. Nedavno su enzimski protuupalni lijekovi postali vrlo popularni u odnosu na konvencionalne kemijske lijekove. Konvencionalni lijekovi koji se koriste za liječenje akutne upale nazivaju se NSAID (nesteroidni protuupalni lijekovi) koji se koriste pojedinačno ili u kombinaciji s drugim lijekovima. NSAID, međutim, imaju nekoliko ograničenja, kao što su nuspojave. Kako bi se savladala takva ograničenja konvencionalnih lijekova, razvijeni su protuupalni lijekovi usmjereni na enzime (Sugathan et al., 2017).

### 4.1. Serratiopeptidaza

Serrapeptidaza je terapijski enzim sa širokim spektrom kliničkih primjena. To je enzim koji proizvodi bakterija *Serratia* E-15 izolirana iz crijeva svilene bube *Bombyx mori*. Također je poznat kao serratiopeptidaza ili seralizin. To je proteaza koja pripada obitelji tripsina, a ima molekularnu masu od oko 52 kDa. Ima cink u svojoj strukturi pa tako pripada i metaloproteazama (Sugathan i sur., 2017). Na slici 6 prikazana je kristalna struktura serratiopeptidaze iz *Serratia sp.* E-15 (Sugathan i sur., 2017). Kao potencijalno protuupalno sredstvo, pokazuje iznimnu sposobnost razgradnje mrtvog i oštećenog tkiva bez oštećenja zdravog tkiva. Često se propisuju u ortopediji, kirurgiji, ginekologiji, otorinolaringologiji i stomatologiji zbog svog analgetskog, antiemetičkog te protuupalnog djelovanja. Također je uključen u liječenje ateroskleroze jer posjeduje kazeinolitička i fibrinolitička svojstva. Serratiopeptidaza može djelovati na mnoge supstrate kao što su kazein, želatina, fibrin i općenito na peptide s vezama kao CysSO<sub>3</sub>H-Gly, Asn-Gln, Tyr-Tyr, Arg-Gly, Gly-Ala, His-

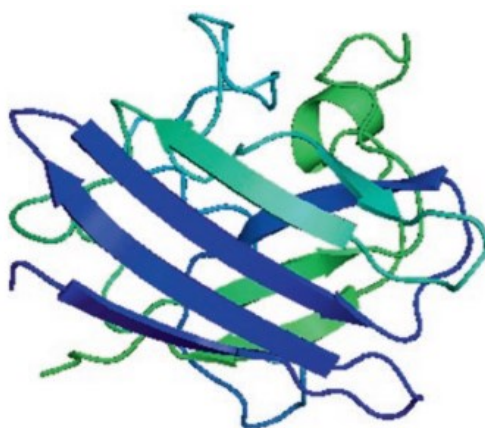
Leu, Tyr-Leu, Ala-Leu, Phen-Tyr, Gly-Gly i Tyr-Thr. Serratiopeptidaza ima direktan utjecaj na imunološki sustav odnosno na pokretljivost stanica jer regrutira limfocite na mjestu upale. Nedavno se pokazalo da serratiopeptidaza može smanjiti propusnost kapilara koju izazivaju bradikinin, histamin i serotonin te može razgraditi abnormalne proteine i eksudate te olakšati apsorpcija razgrađenih produkata u krvi i limfi. Također pospješuje zacjeljivanje rana, a može obnoviti i popraviti upaljeno područje na koži od traume do zdravog tkiva. Pokazalo se da serratiopeptidaza može apsorbirati iz crijeva, vjerojatno endocitozom posredovanom klatrinom. Kada se primjenjuje oralno, ostaje nepromijenjena tijekom apsorpcije. Prodire u sva tkiva, postići veće koncentracije u upaljenim tkivima i dostići najviše razine za otprilike sat vremena. Mnoga istraživanja sugeriraju da ovaj enzim, sam ili u kombinaciji s drugim lijekovima, ima pozitivan terapijski utjecaj kod ateroskleroze, amiloidoze, bronhitisa, sinusitisa, reumatoidnog artritisa, sindroma karpalnog tunela i raznih drugih autoimunih bolesti. Tijekom alergijskih reakcija pokazalo se da serratiopeptidaza smanjuje viskoznost i sloj sluzi i eliminira je putem bronhopulmonalnih sekreta. Može djelovati kao mukolitički ekspektorans, smanjujući viskoznost i povećavajući volumen sluzi kod bronhi-pulmonalnih poremećaja. Štoviše, može razgraditi aterosklerotične plakove, razgraditi i ukloniti naslage kolesterola, fibrina i kalcija s unutarnje površine arterija. Takvi fibrinolitički atributi serratiopeptidaze dodatno pomažu u razrjeđivanju krvi, a time i smanjenju rizika od moždanog udara i tromboflebitisa (Vachher i sur., 2021).



**Slika 6.** Kristalna struktura serapeptaze iz *Serratia sp.* E-15 (Sugathan i sur., 2017)

## 4.2. Superoksid dismutaza

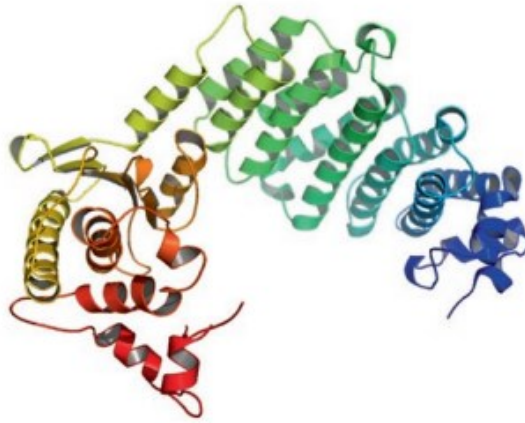
Superoksid dismutaza (SOD) je enzim koji se koristi za prevenciju toksičnosti kisika. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) nastaju iz kisika što uzrokuje oksidativni stres i oštećenje stanica (Sugathan i sur., 2017). To uključuje superoksidne anione, vodikov peroksid i hidroksilne radikale. Oni djeluju kao posrednici oksidativnog stresa. Superoksid dismutaza (SOD) je prisutna u gotovo svim stanicama te je jedna od najznačajnijih obrambenih sustava. SOD pripada širokoj klasi metaloenzima. Različiti oblici SOD-a nalaze se u prirodi i kategorizirani su na temelju metalnih kofaktora, uključujući SOD-ove nikla, mangana, željeza i bakra/cinka. Struktura se sastoji od osam beta-uzvojnica koje čine beta-bačvu, koja s dvije površinske petlje čvrsto drži aktivno mjesto. Slika 7 prikazuje kristalografsku strukturu superoksid dismutaze (Vachher i sur., 2021). Postoje dvije podjedinice koje su čvrsto povezane uglavnom hidrofobnim i s nekoliko elektrostatskih interakcija. Enzim može pretvoriti membranski nepropusni superoksidni anion koji nastaje kao nusprodukt aerobnog metabolizma u membranski difuzijski vodikov peroksid, koji se tako može detoksificirati djelovanjem katalaze i peroksidaze. SOD se koristi u terapiji kao snažan antioksidans i kao protuupalno sredstvo. SOD ima učinkovitost u liječenju upalnih bolesti kao što su reumatoidni artritis i osteoartritis, a također je učinkovit za uklanjanje nuspojava povezanih s kemoterapijom i zračenjem (Vachher i sur., 2021).



**Slika 7.** Kristalografska struktura bizonove superoksid dismutaze (Vachher i sur., 2021)

### 4.3. Kolagenaze

Kolagenaza je proteolitički enzim koji razgrađuje kolagen. To je proteinaza specifična za kolagen koji ima trostruku spiralnu strukturu dok nijedna od ostalih proteinaza ne cijepa kolagen (Sugathan i sur., 2017). Kolagenaza se veže za nekrotično tkivo na površini rane i razgrađuje kolagen te tako olakšava zacjeljenje rane. Ima tercijernu strukturu u obliku sedla s cinkom u aktivnom mjestu. Cinkova grupa je tetraedarnu koordinirana bočnim lancima dvaju histidina, jednog glutamata i ostatka vode, pri čemu je molekula vode dalje vezana vodikovom vezom na drugi glutamatni ostatak. Slika 8 prikazuje strukturu kolagenaze (Sugathan i sur., 2017). Bakterijske kolagenaze su metaloproteaze koje služe kao važni čimbenici virulencije zbog svoje sposobnosti razgradnje ekstracelularnih matriksa. Kolagenaza koju proizvodi *Clostridium histolyticum* koristi se za uklanjanje ožiljaka od opekline kao zamjena za kirurško uklanjanje mrtvog tkiva iz rane. Ovaj enzim selektivno i bezbolno razgrađuje nekrotična mrtva tkiva. Pomaže u zacjeljenju rana stvaranjem peptida dobivenih iz kolagena koji dovode do pojačane makrofagne kemotaksije, povećanog lučenja citokina i tako potiču zacjeljenje rana. Također je poznato da kolagenaza liječi Dupuytrenovu bolest (DD), fibroproliferativni poremećaj, karakteriziran rastom i uzastopnim kontrakturama pojedinačnih dijelova palmarne aponeuroze, što dovodi do značajnog ograničenja funkcije šake u uznapredovalim stadijima bolesti. Dolazi do taloženja kolagenom bogatih vrpca i progresivnog savijanja prstiju. To je iscrpljujuća doživotna bolest s promjenjivim tijekom i heterogenom kliničkom slikom. Injekcije kolagenaze iz *Clostridium histolyticum* su predložene kao prva linija liječenja za Dupuytrenove bolesti (Vachher i sur., 2021).



**Slika 8.** Kristalografska struktura kolagenaze G iz *Clostridium histolyticum* (pdb id: 2Y50) (Sugathan i sur., 2017)

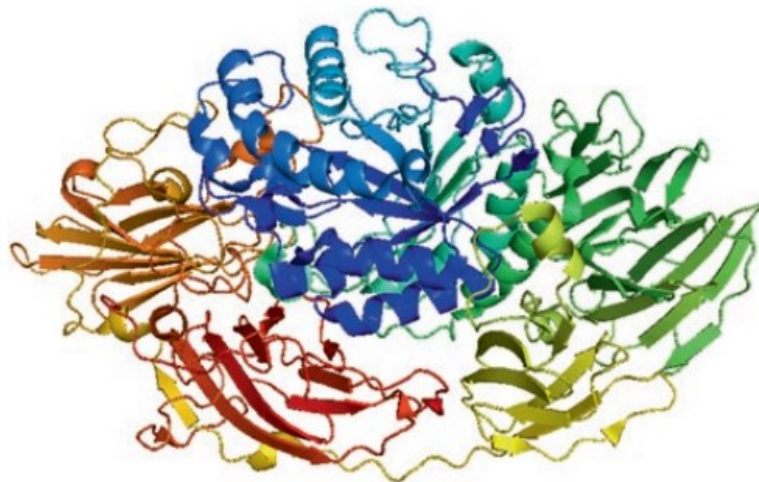
## 5. Probavni enzimi

Probavni enzimi hidroliziraju složene ugljikohidrate, lipide i proteine u jednostavnije komponente koje se lako apsorbiraju u tijelu. Malapsorpcija nastaje zbog odsutnosti određenih probavnih enzima, koji normalno probavljaju složene prehrambene materijale u hranjive tvari koje se mogu apsorbirati. Upotreba probavnih enzima kao suplemenata može biti vrlo značajna u liječenju probavnih poremećaja, koje karakteriziraju probavne smetnje, što dovodi do nelagode, pothranjenosti i težih komplikacija. Trenutno enzimi životinjskog podrijetla predstavljaju standard u liječenju probavnih poremećaja, ali mikrobnii enzimi imaju veće obećanje u terapiji probavnim enzimima. Mikrobnii enzimi nude prednosti kao što su zahtjevi za nižim učinkovitim dozama, poboljšana specifična aktivnost, otpornost na inaktivaciju kiseline i proteolitičku probavu te aktivnost u širem rasponu pH od životinjskih analoga (Vachher i sur., 2021). Česti su probavni poremećaji, poput malapsorpcije, netolerancije na laktozu i celijakije (Sugathan i sur., 2017).

### 5.1. $\beta$ -Galaktozidaza

Galaktozidaza (laktaza, EC 3.2.1.108) hidrolizira disaharid laktoze u njene sastavne

monosaharide, glukozu i galaktozu. Slika 9 prikazuje strukturu galaktozidaze (Sugathan i sur., 2017). Netolerancija na laktozu je genetski poremećaj koji nastaje zbog nedostatka ovog enzima, što dovodi do gastrointestinalnih simptoma. Ovaj enzim se široko koristi u prehrambenoj industriji za proizvodnju hidroliziranih proizvoda laktoze za osobe s intolerancijom na laktozu. To je jedan od najčešćih gastrointestinalnih poremećaja. Eliminacija mlijeka i mliječnih proizvoda uobičajena je praksa za prevladavanje intolerancije na laktozu. No laktoza je izvrstan izvor energije, a izbjegavanje mliječnih proizvoda dovodi do pothranjenosti, posebice manjka kalcija i minerala. Liječenje netolerancije na laktozu postiže se terapijom suplementacije enzima. Za to se koriste enzimi  $\beta$ -galaktozidaze dobiveni iz različitih izvora. Izvori uključuju kvasce kao što su *Kluyveromyces fragilis* i *K. lactis*, gljive kao što su *Aspergillus niger* i *A. oryzae* te bakterije poput *Bacillus coagulans*. Drugi pristup prevladavanju netolerancije na laktozu je suplementacija mliječnim proizvodima zajedno s probioticima. U probioticima su prisutni neki od mikroorganizama koji proizvode  $\beta$ -galaktozidazu kao što su *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Lactococcus*.



**Slika 9.** Kristalografska struktura  $\beta$  galactosidase iz *Aspergillus oryzae* (pdb id: 4IUG) (Sugathan i sur., 2017)

## 5.2. Enzimi gušterače za malapsorpciju

Malapsorpcija je često uzrokovana egzokrinom insuficijencijom gušterače (EPI), što se odnosi na nemogućnost ili nedovoljnu proizvodnju probavnih enzima gušterače. EPI se može pojaviti zbog različitih kliničkih stanja kao što su cistična fibroza, kronični pankreatitis gušterače,

operacija gušterače, itd. Enzimi gušterače obično sadrže amilazu, lipazu i proteazu. Proteaza razgrađuje proteine u hrani do peptida; amilaza razgrađuje ugljikohidrate osim celuloze u oligo i disaharide; dok lipaza hidrolizira mast u masne kiseline i monogliceride. Nedostatak amilaze i proteaze gušterača obično nadoknađuje amilazom iz enzima pljuvačke, pepsinom iz želučanog soka, peptidaze i saharidaze iz sluznice tankog crijeva i dr. Probava masti uglavnom se postiže pankreatičnom lipazom, a njezina insuficijencija predstavlja veliki zdravstvenu zbrinutost zbog EPI. Gubitak težine, steatoreja, bolovi u truhu, itd. su neki od simptoma povezani s EPI. Osim toga, manjak vitamina topivih u mastima javlja se kod pacijenata s EPI. Steatoreja se javlja kod insuficijencije gušterače dok je količina pankreasne lipaze pala na manje od 10 % normalnog lučenja. Jedna od najboljih načina za prevladavanje malapsorpcije zbog EPI je enzimska terapija ili nadomjesna terapija enzimima gušterače (PERT). Enzimi gušterače dostupni su iz raznih izvora uključujući životinjske, biljne i gljivične izvore (Sugathan i sur., 2017).

### 5.2.1. Amilaze

Amilaze kataliziraju razgradnju škroba na maltotriozu, maltozu, glukozu i dekstrine. Nalaze se u slini i pomažu u probavi hrane. Amilaze imaju širok spektar primjene u različitim industrijama poput prehrambene, alkoholne, tekstilne, industrije deterdženta i papira.  $\alpha$ -amilaze (EC 3.2.1.1) iz *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* i *Bacillus amyloliquefaciens* nalaze različite primjene u industriji hrane, fermentacije i papira. Amilaze se često koriste u prethodnoj obradi stočne hrane jer poboljšavaju probavljivost vlakana. Tvrtka Parke-Davis prva je upotrijebila ljekovita svojstva amilaze iz *Aspergillus oryzae* i označila je kao Takadiastase. Takadiastase se koristi kao pomoć za probavu u liječenju dispepsije koja nastaje kao posljedica nepotpune razgradnje škroba.

### 5.2.2. Lipaze

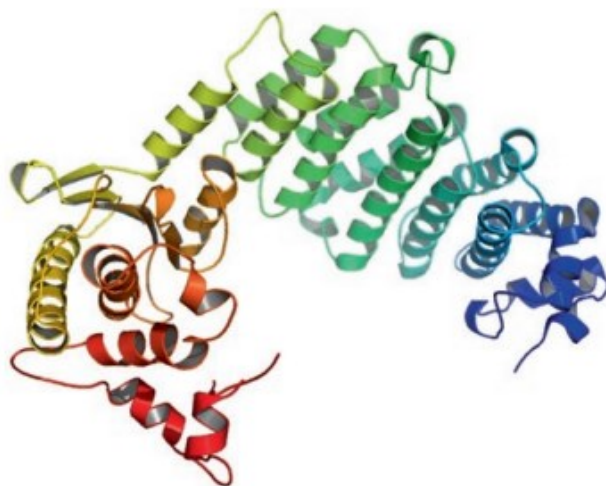
Lipaze (EC 3.1.1.3) su široka kategorija enzima koji pomažu u probavi masti. Egzokrina insuficijencija gušterače koja se očituje nedostatkom enzima gušterače rezultira smanjenom probavom i malapsorpcijom svih makronutrijenata, pri čemu je nedostatak masti od najveće



kliničke važnosti. Lipaza je najmanje stabilna među svim enzimima gušterače i često biva uništena želučanom kiselinom. Pokušano je prevladati inaktivaciju enzima istodobnom primjenom bikarbonata i antacida.

### 5.3. Glutenaze

Celijakija je netolerancija na protein gluten u hrani kod osoba s genskom predispozicijom. To je autoimuna bolest koja je upalni odgovor na gluten što dovodi do ozljede sluznice tankog crijeva i malapsorpcije hranjivih tvari. Gluten je dijetetski protein koji se nalazi u piru, pšenici, ječmu i raži, a bogat je glutaminom i prolinom. Jedina trenutno dostupna metoda za prevladavanje celijakije jest dijeta bez glutena. No, obilje glutena u raznim dijetama čini ga iznimno teškim za izbjegavanje. Prolil endopeptidaza (PEP, EC 3.4.21.24) hidrolizira unutarnje ostatke prolina u peptidima. Ovaj enzim se preporučuje kao oralni enzimski dodatak za celijakiju i za detoksikaciju glutena u hrani. Prolil oligopeptidaze izolirane iz *Flavobacterium mengiosepticum*, *Sphingomonas capsulate* i *Myxococcus xanthus* sposobne su hidrolizirati peptide prisutne u gastrointestinalnom traktu koji sadrže prolin, te su otporne na probavu proteazom. Slika 10 prikazuje strukturu glutenaze G (Sugathan i sur., 2017). AN-PEP, prolil endopeptidaza izolirana iz *Aspergillus niger*, sposoban je razgraditi gluten i srodne peptide u samom želucu prije nego što stignu u tanko crijevo, budući da je otporna na razgradnju želučanih sokova u želucu (Sugathan i sur., 2017).



**Slika 10.** Kristalografska struktura glutenaze G iz *Clostridium histolyticum* (pdb id: 2Y50)

## 6. Antimikrobni enzimi (enzibiotici)

Na globalnoj razini, u posljednjih nekoliko desetljeća, raširena uporaba i zlouporaba antibiotika dovela su do značajnog porasta antimikrobne rezistencije uočenih u mnogim patogenim bakterijama kao što su *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*. To je dodatno pogoršano ograničenim brojem novih antibiotika, koji imaju nove mehanizme djelovanja, što je ključno za sadašnji scenarij povećanja rezistencije na antibiotike. Stoga postoji neposredna potreba za razvojem novih antibakterijskih lijekova koji mogu eliminirati mikrobe rezistentne na lijekova. Zanimljiva i obećavajuća klasa jedinstvenih antibakterijskih sredstava su enzibiotici. Enzibiotici su novi istraživački pristup antibioticima koji koristi enzime u borbi protiv zaraznih patogenih bakterija. Oni uključuju klasu enzima koji razgrađuju stanične stijenke bakterija koji se sastoje od lizina, bakteriocina, autolizina i lizozima. Najznačajnija i najizrazitija prednost enzibiotika je sposobnost eliminacije mikroba otpornih na antibiotike (Vachher i sur., 2021). Neki peptidi djeluju na membranu bakterija putem elektrostatičke interakcije, neki djeluju na ionske kanale mijenjajući tako unutarnji pH organizma, drugi peptidi osim ciljanja na membranu mogu djelovati i na intracitoplazmatske molekule poput lipida II, a određeni peptidi mogu proći kroz membranu i akumulirati se unutar citoplazme, čime smanjenje vitalnosti mikroba. Izazovi s kojima se susreću ovi peptidi uključuju poteškoće u isporuci na ciljana mjesta koja prolaze kroz jedinstvenu staničnu stijenku, stabilnost peptida u fiziološkim uvjetima i razgradnju citoplazmatskom proteazom (Sugathan i sur., 2017).

### 6.1. Lizini

Lizini ili endolizini (EC 3.2.1.17) su enzimi kodirani dvolančanom DNA bakteriofaga koji inficiraju Gram-pozitivne bakterije. Obično se sastoje od jednog polipeptidnog lanca koji ima veznu domenu za stanične stijenke (CBD) na C-terminalu i katalitičku domenu na N-terminalu. Dvije domene se drže zajedno uz pomoć kratkog i fleksibilnog linkera. Enzim katalizira cijepanje peptidoglikanskog sloja, djelujući kao peptidoglikanske hidrolaze. Prirodno se proizvode u bakterijskim stanicama inficiranim fagom tijekom litičkog ciklusa faga i šire se po

sloju peptidoglikana putem membranskih lezija koje proizvode holini. Zatim cijepaju peptidoglikanski sloj, izazivajući lizu domaćina i omogućavajući oslobađanje faga. Izraz endolizin označava njihov način proizvodnje jer djeluju na sloj peptidoglikana unutar bakterije u kojoj su napravljeni. Dakle, rekombinantni enzimi koji djeluju na sloj peptidoglikana izvan stanice nazivaju se lizini. Lizini dovode do cijepanja kovalentnih veza prisutnih u peptidoglikanu. Na temelju specifičnosti, lizini su grupirani u pet glavnih kategorija: N-acetilmuramoil-L-alanin amidaze, N-acetilmuramidaze/lizozimi, endo- $\beta$ -N-acetilglukozaminidaze, endopeptidaze i litičke transglikozilaze. Neki lizini također mogu ubiti bakterijske stanice neenzimatski, destabilizirajući bakterijsku plazma membranu, koristeći peptide koji posjeduju svojstva poput pozitivnog naboja, amfipatske sekundarne strukture i hidrofobnosti, nalik na kationske antimikrobne peptide. Druga značajka većine lizina je vrlo uzak antibakterijski raspon koji je ograničen na bakterije domaćina bakteriofaga koji kodira za enzim. Međutim, lizini mogu ubiti većinu sojeva unutar određene bakterijske vrste (Vachher i sur., 2021).

## 6.2. Lizozimi

Lizozimi ili  $\beta$ -1,4-N-acetilmuramidaze (EC 3.2.1.17) su hidrolitički enzimi koji specifično cijepaju  $\beta$ -1,4 glikozidne veze između N-acetilmuramske kiseline i N-acetilglukozaminskih dijelova u peptidoglikanskom sloju. Lizozimi općenito imaju 129 aminokiselina koje se savijaju i tvore kompaktnu globularnu proteinsku strukturu s dubokim rascjepom na površini. Tetrasaharid do heksasaharidnih podjedinica koje pripadaju bakterijskoj staničnoj stijenci mogu se vezati u ovaj rascjep. Lizozimi igraju vrlo važnu ulogu u obrani i sveprisutno su izraženi u biljnim i životinjskim carstvima. Lizozime također proizvode različiti mikrobi uključujući bakterije i viruse. Kod ljudi, lizozim proizvode sve imunološke stanice, a može se naći u biološkim tekućinama i tkivima kao što su urin, suze, slina, mlijeko, hrskavica, jetra i koža. Lizozimi su nađeni u bakterijama kao što su *Staphylococcus aureus*, *Arthrobacter crystallopoites*, *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *Enterococcus hirae* i *Streptomyces griseus*. Mnogi fagi također proizvode lizozime koji pomažu njihovom ulasku u bakterijske stanice domaćina i za indukciju lize pred kraj litičkog ciklusa. Lizozimi mogu ubiti samo Gram pozitivne bakterije, jer Gram-negativne bakterijske vrste posjeduju vanjsku membranu. Neke iznimke postoje, poput Gram-pozitivnih bakterija rezistentnih na lizozim, poput nekoliko

sojeva *Enterococcus faecalis*. Ostale iznimke uključuju Gram-negativne bakterije osjetljive na lizozim poput *Capnocytophaga gingivalis*. Razvijeno je i nekoliko nadogradnji lizozima koji mogu lizirati i nekoliko Gram-negativnih bakterijskih vrsta (Vachher i sur., 2021).

### 6.3. Bakteriocini

Bakteriocini su raznolika skupina ribosomski sintetiziranih peptida ili proteini s mikrobicidnim djelovanjem protiv vrsta ili sojeva koji su usko povezani s bakterijama koje su ih proizvele. Bakteriocini se često razlikuju po molekularnoj težini, spektru djelovanja, biokemijskim karakteristikama i mehanizmu djelovanja. Nekoliko antimikrobnih tvari koje proizvodi *Bacillus* spadaju u klasu I bakteriocina. Oni uključuju lantibiotike koji su male molekularne težine, genski kodirani peptidi karakterizirani prisutnošću policikličkih tioeterskih aminokiselina, lantionona i/ili metil lantionina koji su uključeni u formiranje prstenaste strukture putem intramolekularnih posttranslacijskih modifikacija. Također ih karakterizira prisutnost neobičnih aminokiselina didehidroalanin (Dha) i didehidrobutirin (Dhb). Lantibiotici se dijele u skupinu A i skupinu B na temelju njihove molekularne težine, strukture i biološke aktivnosti. Lantibiotici tipa A (2,1-3,5 KDa, 21-38 aminokiselinskih ostataka) općenito imaju linearniju sekundarnu strukturu i aktivni su u nanomolarnim koncentracijama protiv Gram-pozitivnih bakterija. Oni ubijaju svoje mete tako što stvaraju pore u citoplazmatskoj membrani. Zoocin A je potencijalni enzibiotik koji proizvodi *Streptococcus equis* sp *zooepidemicus* 4881. Ima katalitičku N-terminalnu domenu koja pokazuje aktivnost endopeptidaze i C-vežući staničnu stijenk. terminalna domena. Uočeno je da su *Streptococcus mutans* i *S. pyogenes* osjetljivi na djelovanje Zoocina A, dok je za *S. gordonii*, *S. oralis* i *S. rattus* utvrđeno da su rezistentni na lizu pomoću Zoocina A. Lysostaphin kodiran *Staphylococcus simulans* biovar. *staphylolyticus* je endopeptidaza. Cijepa glicil-glicil veze prisutne u interpeptidnim poprečnim mostovima, točnije peptidoglikana. Lizostafin može ubiti sve sojeve *S. aureus*, uključujući MRSA, i sojeve koji pokazuju rezistenciju na vankomicin. Utvrđeno je i da lizostafin uklanja biofilmove stafilokoka. Početna primjena lizostafina u medicini bila je uklanjanje stafilokoka koji koloniziraju sluznicu nosa, što bi moglo biti polazište za razne infekcije. Druga potencijalna primjena je inhibicija kolonizacije katetera oblaganjem njihovih površina ovim molekulama enzima. Nadalje, lizostafin se koristi u liječenju lokalnih i sistemskih stafilokoknih infekcija. Također se pokazalo da lizostafin djeluje

sinergistički s dodatnim kationskim antimikrobnim peptidima, litičkim enzimima i antibioticima. Neki drugi važni primjeri bakteriocina uključuju mikrocin V iz *E.coli*, piocine i talocine iz *Pseudomonas aeruginosa* i nisin iz *Lactococcus lactis*. Nisin je siguran i komercijalno odobren od strane FDA kao sredstvo za konzerviranje hrane. Koristi se kao konzervans za sprječavanje rasta patogenih bakterija koje kontaminiraju prehrambene proizvode. Ostali enzibiotici navedeni su u tablici 2.

**Tablica 2.** Različiti enzibiotici zajedno s njihovim izvorima i sojevima na koje djeluju (Meghwanshi i sur., 2020)

Klasa enzima	Naziv	Mikroorganizam producens	Ciljani soj	Način djelovanja
lizin	Cpl-1	Phage Cp-1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Muramidaza
	LambdaSa2Prophage Lysin	Prophage LambdaSa2	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , group E <i>Streptococci</i> , <i>S. equii</i> , group G <i>Streptococci</i> , <i>S. agalactiae</i>	Endopeptidaza, Glukosaminidaza
	Pal	Phage Dp-1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Amidaza
	Ply GBS	Phage NCTC 11261	<i>Streptococcus agalactiae</i> , Groups A, C, G, L <i>Streptococci</i>	Endopeptidaza, Muramidaza
	PlyC	Phage C1	<i>Streptococcus pyogenes</i> , grupe C i E <i>Streptococci</i>	Amidaza
autolizin	Lyt A	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Amidaza

**Tablica 2.** Različiti enzibiotici zajedno s njihovim izvorima i sojevima na koje djeluju - nastavak (Meghwanshi i sur., 2020)

Klasa enzima	Naziv	Mikroorganizam producens	Ciljani soj	Način djelovanja
bakteriocin	Lysostaphin	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>coagulase-negative Staphylococci</i>	Endopeptidaza
	Zoocin A	<i>Streptococcus equi</i>	<i>Streptococcus equi</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. gordonii</i>	Endopeptidaza
lizozim	SE lysozyme	<i>Streptomyces erythraeus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Muramidaza

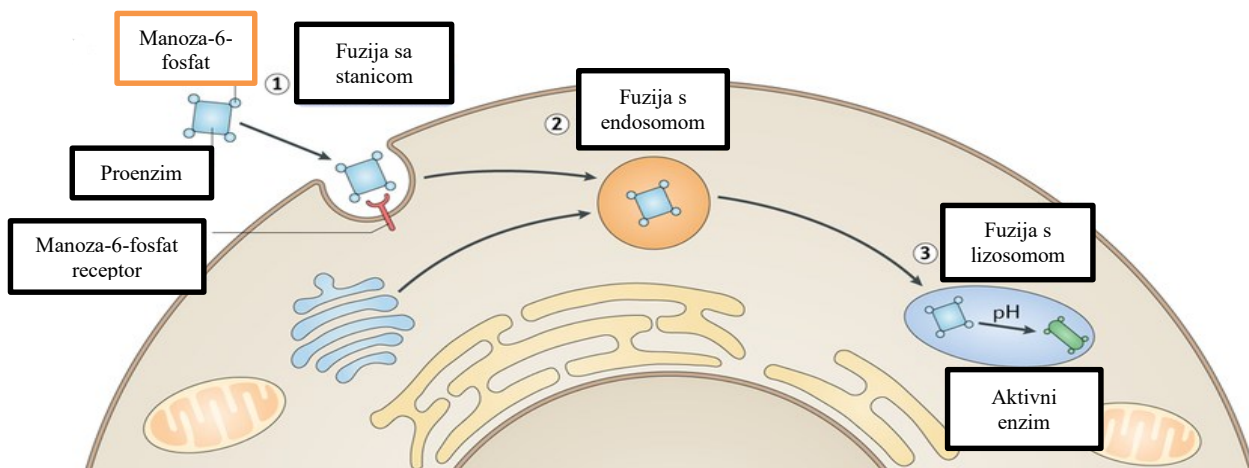
## 7. TERAPIJSKI ENZIMI ZA RIJETKE BOLESTI

Iako rijetke bolesti po definiciji pogađaju mali broj pacijenata, procjenjuje se da zajedno obuhvaćaju oko 350 milijuna pacijenata na globalnoj razini, što je više nego dvostruko više od broja pacijenata oboljelih od AIDS-a i raka zajedno. Primjena enzima omogućila je nadomjesnu terapiju u slučaju genske mutacije zbog koje organizam ne proizvodi enzim ili zamjenu disfunkcionalnih cirkulirajućih proteina (Tambuyzer i sur., 2020). Opisano je nekoliko njih s različitim svojstvima.

### 7.1. Cerliponaza alfa

Neuronske ceroidne lipofuscinoze (NCL) su skupina nasljednih progresivnih degenerativnih

bolesti mozga (lizosomskih bolesti) koje zajedno predstavljaju najčešću skupinu encefalopatija u djece (Segura Espitia i sur., 2021). Cerliponaza alfa rekombinantna je humana tripeptidil peptidaza-1 (TPP1, EC 3.4.14.9) koja je proizvedena pomoću stanične linije ovarija kineskog hrčka (Kos i Šušković, 2021). Rekombinantna humana cerliponaza alfa jedina je dostupna terapija koja modificira bolest i pokazalo se da usporava napredovanje usporenog govora i motoričke smetnje u usporedbi s pacijentima koji primaju samo simptomatsko liječenje. (Segura Espitia i sur., 2021). Na slici 11 prikazano je djelovanje enzima unutar stanice (Johnson, i sur., 2019). Terapijski enzim Brineura (cerliponaza alfa) razvila je tvrtka BioMarin Pharmaceutical, a odobren je 2017. godine od strane US FDA i EMA za terapiju neurodegenerativne pedijatrijske bolesti uzrokovane nedostatkom ovog enzima (Kos i Šušković, 2021).



**Slika 11.** Cerliponaza alfa, rekombinantni proenzim koji sadrži post-translacijsku modifikaciju manoza-6-fosfata, primjenjuje se intraventrikularno u mozak pacijenta. Proenzim se veže na receptor za manoza-6-fosfat na citoplazminoj membrani i ulazi u stanicu (1), gdje se veže na endosom (2) prije nego što se isporuči u lizosom, gdje se u kiselom okruženju autokatalitički transformira u aktivni oblik enzima (Johnson i sur., 2019)

## 7.2. Alglukozidaza alfa

Alglukozidaza alfa rekombinantna je humana kisela alfa-glukozidaza (GAA - acid alpha-glucosidase, EC 3.2.1.20.) koja se proizvodi pomoću stanične linije ovarija kineskog hrčka. GAA razgrađuje glikogen, a kod pacijenata s deficitom ovog enzima nakupljanje glikogena izaziva miopatiju (Genzyme Myozyme® i Lumizyme®, Odobrenja: FDA 2006, 2010; EMA

2006, 2009) (Concolino i sur., 2018).

### **7.3. Galsulfaza**

Galsulfaza je rekombinantna humana arilsulfataza B (rhASB, EC 3.1.6.12) koja se proizvodi pomoću stanične linije ovarija kineskog hrčka (Naglazyme®, BioMarin Pharmaceutical; Odobrenje: FDA, 2005) za pacijente s mukopolisaharidozom tipa VI - nedostatkom N-acetilgalaktozamin 4-sulfataze (arilsulfataza B) što uzrokuje progresivni poremećaj s višestrukim zahvaćanjem organa i tkiva što često dovodi do smrti pacijenta. U lizosomima hidrolizira sulfat s nereducirajućeg kraja glikozaminoglikana keratan sulfata i kondroitin-6-sulfat (Kos i Šušković, 2021).

### **7.4. Elosulfaza alfa**

Elosulfaza alfa humani je hidrolitički lizosomski glikozaminoglikan (GAG)-specifični enzim, N-acetilgalaktozamin-6-sulfataza (EC 3.1.6.4), indiciran za pacijente s mukopolisaharidozom tipa IVA koji se proizvodi pomoću stanične linije ovarija kineskog hrčka (Vimizim®, BioMarin Pharmaceutical; Odobrenje: FDA, 2014) (Concolino i sur., 2018).

### **7.5. Sakrozidaza**

Sakrozidaza ( $\beta$ -fruktofuranozid fruktohidrolaza, EC 3.2.1.26) je još jedan enzim koji se koristi za liječenje kongenitalnog nedostatka sukrazeizomaltaze (CSID) (Meghwanshi i sur., 2020). Saharaza-izomaltaza je enzim s dvostrukom funkcijom, s dvije domene GH31, jedna služi kao izomaltaza, a druga kao saharoza  $\alpha$ -glukozidaza (Kos i Šušković, 2021). Pacijenti s CSID-om ne mogu probaviti disaharid saharozu. Lijek na bazi sakrozidaze hidrolizira saharozu, pomažući u njezinoj probavi dopuštajući konzumaciju uobičajenih namirnica s dodanom saharozom ili voćem koje na neki drugi način sadrži saharozu. Za liječenje je upotrijebljena sakrozidaza iz *S. cerevisiae* koja se može uzimati oralno (Meghwanshi i sur., 2020).



## 7.6. $\beta$ -glukocerebrozidaza

Gaucherova bolest je nasljedna bolest koju karakterizira nedostatak enzima glukocerebrozidaze što rezultira nakupljanjem glukocerebrozida u lizosomima (Sugathan i sur., 2017).  $\beta$ -glukocerebrozidaza (EC 3.2.1.45) je glikozilirani protein, lizosomski enzim, koji hidrolizira  $\beta$ -glukozidnu vezu glukocerebrozida, međuprodukata u metabolizmu glikolipida, na glukozu i keramid (Kos i Šušković, 2021). Stanice nakupljene lipidima nazivaju se Gaucherovim stanicama i nalaze se u jetri, slezeni, koštanoj srži i plućima. To ga čini multiorganskim poremećajem. Bolest je karakterizirana hepatosplenomegalijom (povećanje jetre i slezene) i skeletnim komplikacijama. Gaucherova bolest je klasificirana u tri tipa na temelju kliničkih manifestacija. Kod tipa I-neuronopatskog (odrasli) središnji živčani sustav nije uključen. Ali u slučaju tipa II-akutne neuronopatske (infantilne) i tipa III-subakutne neuronopatske (juvenilne) središnji je živčani sustav uključen. Najčešći među njima su tip 1 kod kojeg nije zahvaćen središnji živčani sustav. Kontrola bolesti provodi se ili enzimskom nadomjesnom terapijom (ERT) ili terapijom smanjenja supstrata. Utvrđeno je da je enzimska nadomjesna terapija uspješna u liječenju Gaucherove bolesti. Kao što je prethodno spomenuto, enzimska nadomjesna terapija je prvi put uspostavljena za liječenje Gaucherove bolesti gdje je korištena algluceraza (Ceredase®), enzim glukocerebrozidaza dobiven iz placente (Sugathan i sur., 2017). Enzimska nadomjesna terapija s alglucerazom (Ceredase), glukocerebrozidazom pročišćenom iz humane placente odobrena je od FDA 1991., zatim je 1994. odobrena imigluceraza (Cerezyme), rekombinantni enzim proizveden u kultiviranim stanicama jajnika kineskog hrčka (CHO), a 2010. odobrena je velagluceraza alfa (VPRIV), rekombinantni enzim koji se proizvodi s humanim staničnim linijama fibrosarkoma. taligluceraza alfa (Elelyso) odobrena od FDA 2012., za intravenoznu infuziju, je rekombinantna  $\beta$ -glukocerebrozidaza, koji se proizvodi u genetički modificiranim stanicama korijena mrkve, uzgojem u plastičnom bioreaktorskom sustavu za jednokratnu uporabu (ProCellEx®). Od humane glukocerebrozidaze se razlikuje u dvije aminokiseline na N- i 7 aminokiselina na C-terminalnom kraju za ciljano djelovanje na vakuole. Manozu na N-terminalnom kraju specifično prepoznaju endocitni receptori za ugljikohidrate na makrofagima, stanicama koje akumuliraju lipide u Gaucherovoj bolesti (Kos i Šušković, 2021).

## 8. ZAKLJUČCI

1. Enzimi pokazuju golem terapijski potencijal s velikim značajem. Mikrobna proizvodnja terapijskih enzima je ekonomski i ekološki prihvatljiva. Bitni su u liječenju mnogih bolesti, poput upotrebe fibrinolitičkih enzima u liječenju infarkta miokarda, plućnog zgrušavanja i venskog moždanog udara, kontroli infekcija enzibioticima, liječenju raka enzimima koji razgrađuju aminokiseline, liječenju rana i upale protuupalnim enzimima i lakšom probavom hrane pomoću probavnih enzima.
2. Korištenje bioloških lijekova na bazi proteina općenito nudi ogromne mogućnosti za razvoj visoko učinkovitih i specifičnih terapija. Bez obzira na to je li sam enzim lijek, odgovoran za aktivaciju predliješkova ili služi kao marker bolesti, funkcionalna svestranost proteina i njihova evolutivnost čine ove biološke makromolekule moćnim i gotovo neograničenim resursom za kliničke primjene.
3. Razvoj novih terapijskih enzima kao i nadogradnja i poboljšanja postojećih primjenom proteinskog inženjerstva su prioritet. Izolaciju, regulaciju, proizvodnju i primjenu enzima kao biofarmaceutika treba unaprijediti do maksimalnog potencijala kako bi se iskoristile njihove prednosti u odnosu na kemijska terapijska sredstva u liječenju različitih bolesti.

## 9. POPIS LITERATURE

Alcalde, M. (2017) Directed enzyme evolution: Advances and applications, 1 izd., Springer International Publishing, Stuttgart, str. 17-69.

Bax, B.E., 2020. Erythrocytes as carriers of therapeutic enzymes. *Pharmaceutics*, 12(5), p.435.

Concolino D, Deodato F, Parini R (2018) Enzyme replacement therapy: efficacy and limitations. *Ita J Pediatr* 44(2), 117-126.

Delage B, Fennell DA, Nicholson L, McNeish I, Lemoine NR, Crook T, Szlosarek PW (2010) Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Cancer* 126, 2762–2772.

Johnson T B, Cain JT, White KA, Ramirez-Montealegre D, Pearce DA, Weimer JM (2019)

Segura, O.E., Hernandez, Z., Mancilla, N.I., Naranjo, R.A. and Tavera, L., 2021. Real world effectiveness of cerliponase alfa in classical and atypical patients. A case series. *Molecular*

Genetics and Metabolism Reports, 27, p.100718.

Sugathan, S., Pradeep, N.S. and Abdulhameed (2017) Bioresources and bioprocess in biotechnology: volume 2: exploring potential biomolecules, 1 izd., Springer International Publishing, Singapore, str. 45-75.

Therapeutic landscape for Batten disease: current treatments and future prospects. *Nat Rev Neurol* **15(3)**, 161-178.

Kos B, Šušković J (2021) Predavanja iz predmeta Tehnologija enzima, predavanje 9. Pristupljeno: 28. lipnja 2022. <https://moodle.srce.hr/2021-2022/course/view.php?id=124997>

Meghwanshi, G.K., Kaur, N., Verma, S., Dabi, N.K., Vashishtha, A., Charan, P.D., Purohit, P., Bhandari, H.S., Bhojak, N. and Kumar, R., (2020) Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. *Biotechnology and applied biochemistry* **67(4)**, str. 586-601.

Tambuyzer E, Vandendriessche B, Austin CP, Brooks PJ, Larsson K, Miller Needleman et al (2020) Therapies for rare diseases: therapeutic modalities, progress and challenges ahead. *Nat Rev Drug Discov* **19(2)**, 93-111.

Vachher, M., Sen, A., Kapila, R. and Nigam, A. (2021) Microbial therapeutic enzymes: A promising area of biopharmaceuticals. *Current Research in Biotechnology*, 3 izd., str. 195-208.

Zamarron, C., Lijnen, H.R., Van Hoef, B. and Collen, D., 1984. Biological and thrombolytic properties of proenzyme and active forms of human urokinase–I. Fibrinolytic and fibrinogenolytic properties in human plasma in vitro of urokinases obtained from human urine or by recombinant DNA technology. *Thrombosis and haemostasis* **52(04)**, 19-23.

## Izjava o izvornosti

Ja Toni Slavko Miše izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis