

# Glykozylácia ako dôležitý regulátor funkcie protilátok

## Glycosylation as an Important Regulator of Antibody Function

Uhrík L., Hernychová L., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Súhrn

**Východisko:** Glykozylácia konštantných oblastí protilátok zásadne ovplyvňuje ich interakčné schopnosti s bunkami imunitného systému. Jedná sa o modifikáciu, ktorá okrem biologickej aktivity protilátok zasahuje aj do ich konformácie, stability, rozpustnosti, sekrécie, farmakokinetiky a imunogenosti. Pre ich správnu funkciu nie je podstatná len lokalizácia samotných glykozylácií na molekule protilátok, ale aj štruktúra jednotlivých glykánov. Zmeny glykozylačných profilov protilátok boli popísané u niektorých fyziologických procesov, akými sú tehotenstvo alebo starnutie, ale taktiež u mnohých patologických stavov ako reumatoidnej artritídy, či nádorov žalúdka, pľúc alebo prostaty. Stále existuje celé množstvo neobjasnených mechanizmov, ktoré riadia glykozyláciu protilátok alebo sú týmito modifikáciami naopak regulované. Viaceré zdroje popisujú význam niektorých špecifických glykozylácií ako potenciálnych biomarkerov. **Cieľ:** Cieľom tohto prehľadového článku je zhrnúť a priblížiť doterajšie poznatky o glykozylácií protilátok a upozorniť na ich vplyv na imunitné odpovede a ich úlohu v priebehu ochorenia. Ich dôležitosť podčiarkuje aj to, že väčšina vyvíjaných a využívaných terapeutických protilátok je modifikovaných glykozyláciou. Práve cieľené vnesenie vhodných glykozylácií, ktoré podporujú aktivity akými sú napr. bunková cytotoxicita závislá na protilátkach, bunková fagocytóza závislá na protilátkach alebo cytotoxicita závislá na komplemente, viedlo k zlepšeniu schopnosti týchto protilátok likvidovať patogény alebo nádorové bunky. Preto je oblasti glykozylácie protilátok venovaná stále väčšia pozornosť. Získané znalosti môžu prispieť k ďalšiemu vývoju efektívnych nástrojov diagnostiky a terapie rôznych ochorení.

### Kľúčové slová

protilátky – glykozylácia – farmakológia – imunitný systém – terapia

### Summary

**Background:** The glycosylation of constant regions of antibodies significantly affects their interaction capabilities with immune cells. It is a modification that, in addition to the biological activity of antibodies, has an impact on their conformation, stability, solubility, secretion, pharmacokinetics, and immunogenicity. The location of glycosylations on the molecule is essential for the proper function of the antibody, as is the structure of the individual glycans. Changes in the glycosylation profiles of antibodies have been described in some physiological processes like pregnancy or ageing, but also in many pathological conditions such as rheumatoid arthritis or gastric, lung and prostate tumours. There are still several unexplained mechanisms that control the glycosylation of antibodies or immune responses, which in turn are regulated by these modifications. Multiple sources describe the importance of some specific glycosylations as potential biomarkers. **Purpose:** The aim of this review is to summarise and present the knowledge of the glycosylation of antibodies and to highlight their influence on immune responses and their role during disease. Their importance is also underlined by the fact that the most of these therapeutic antibodies used and developed are modified by glycosylation. The targeted introduction of appropriate glycosylations, which can promote activities such as antibody-dependent cellular cytotoxicity, antibody-dependent cellular phagocytosis or complement-dependent cytotoxicity, have improved the ability of these antibodies to kill pathogens or tumour cells. Therefore, more attention is being paid to this area. In the future, more effective tools for diagnosing and treating certain diseases can be created with better knowledge.

### Keywords

antibodies – glycosylation – pharmacology – immune system – therapeutics

Táto práca bola podporená projektom MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a GAČR 16-044965.

This work was supported by MEYS – NPSI – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and Czech Science Foundation 16-044965.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Lukáš Uhrík

Regionální centrum aplikované  
molekulární onkologie  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: lukas.uhrík@mou.cz

Obdržané/Submitted: 18. 6. 2019

Prijaté/Accepted: 3. 9. 2019

doi: 10.14735/amko20193546

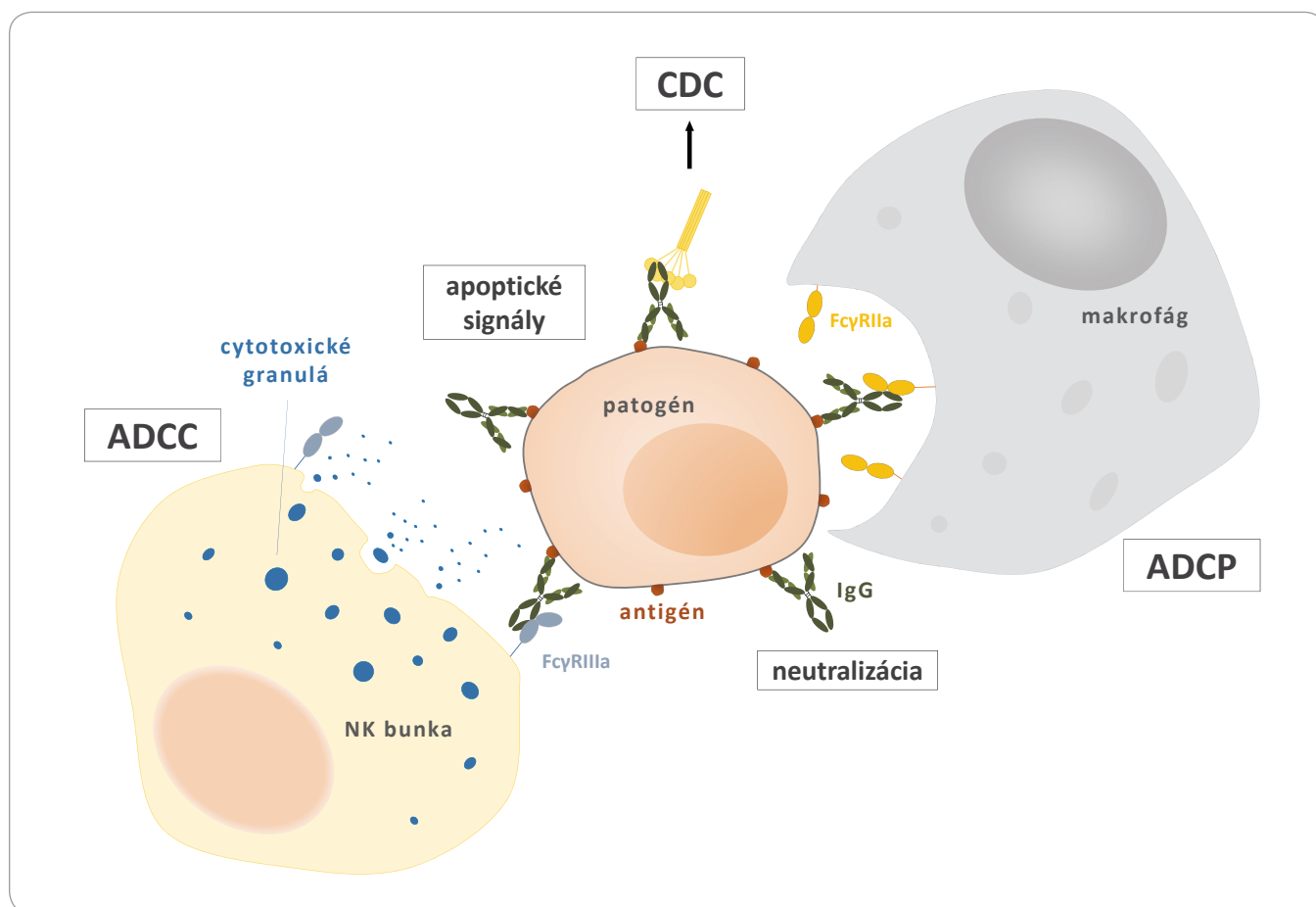
## Úvod

Protílátky, proteíny produkované maturovanými B-lymfocytmi, patria k základným súčastiam humorálnej imunitnej odpovedi. Sú to proteíny zložené z dvoch ľahkých a dvoch ťažkých polypeptidových reťazcov spojených disulfidickými väzbami, pričom sa ich štruktúra skladá z fragmentu viazajúceho antigén (fragment antigen binding – Fab) a konštantného alebo kryštalizujúceho fragmentu (fragment crystallizable – Fc) [1]. Na základe zloženia konštantných oblastí ťažkých reťazcov rozlišujeme päť izotypov ľudských protilátok, imunoglobulíny triedy A (IgA), D (IgD), E (IgE),

G (IgG) a M (IgM) [2]. Biologické funkcie jednotlivých izotypov protilátok podrobne rozoberajú Schoeder et al [3]. Zatiaľ čo sú oblasti určujúce komplexitaritu Fab zodpovedné za väzbu antigénu [4], Fc oblasti umožňujú komunikáciu s ďalšími zložkami imunity, a môžu tak aktivovať mechanizmy, ako sú apoptóza, bunková cytotoxicita závislá na protilátkach (antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC), bunková fagocytóza závislá na protilátkach (antibody dependent cellular phagocytosis – ADCP) a cytotoxicita závislá na komplemente (complement dependent cytotoxicity – CDC) (obr. 1) [5,6].

Existuje niekoľko typov Fc receptorov (FcR) nachádzajúcich sa na ostatných bunkách imunitného systému. Tab. 1 popisuje rôzne typy týchto receptorov. Možu sa odlišovať na izotype protilátok, ktoré dokážu rozoznať, ich afinitu tejto väzby a type buniek, ktoré ich exprimujú. Na základe týchto rozdielov sú spúšťané odlišné dráhy vedúce k likvidácii patogénu [2,7].

Tak ako mnohé iné proteíny aj protílátky podliehajú posttranslačným modifikáciám. N-glykozylácia je najčastejšou modifikáciou membránových a sekretovaných proteínov u eukaryotov [8]. Pri tomto vysoko konzervovanom pro-



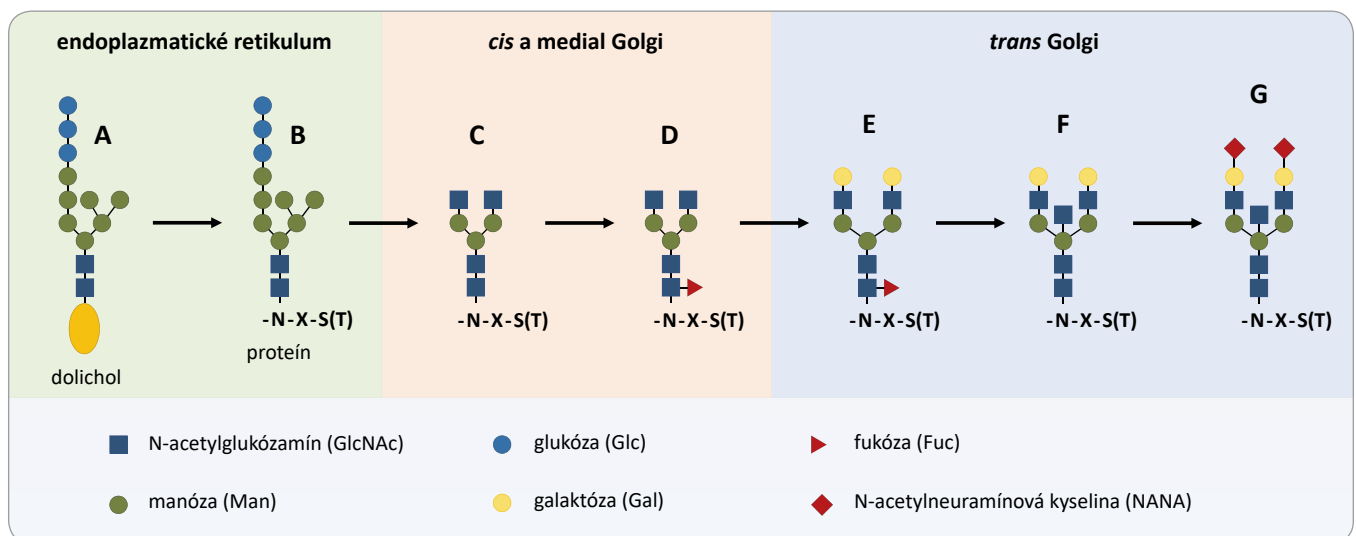
Obr. 1. Protílátky a mechanizmy likvidácie patogénu. Protílátky dokážu likvidovať patogén priamym pôsobením a to väzbou na povrchové molekuly zodpovedné za jeho prichytenie k hostiteľskej bunke (neutralizácia) alebo väzbou na receptory aktivujúce apoptické signály. Protílátky dokážu svojimi Fc oblasťami interagovať s povrchovými receptormi ďalších buniek imunitného systému a spúšťať tak ďalšie imunitné mechanizmy. Na obrázku znázornená NK bunka interaguje prostredníctvom receptoru CD16 (FcγRIIIa) s Fc časťami protilátky vystavenej na povrchu patogénu, aktivuje svoje cytotoxické mechanizmy a uvoľňuje do extracelulárneho priestoru cytotoxické granulá s enzýmami perforínom a granzýmom, ktoré nie sú schopné zabiť len samotný patogén, ale tiež nádorové bunky alebo bunky infikované vírusom (ADCC). Rovnako FcγRIIa receptory makrofágu aktivujú fagocytózu patogénu (ADCP), Fc oblasti taktiež dokážu interagovať so zložkami komplemente a aktivovať tak lýzu bunky (CDC). Prevzaté a upravené z [6].

Fc – konštantné oblasti protilátok, NK – natural killer, ADCC – bunková cytotoxicita závislá na protilátkach, ADCP – bunková fagocytóza závislá na protilátkach, CDC – cytotoxicita závislá na komplemente

**Tab. 1. Fc receptory. Rozdelenie Fc receptorov a ich izoform v závislosti na protilátkach, ktoré dokážu viazať, odlišnostiach v afinitě interakcie a bunkách imunitného systému, na povrchu ktorých sú exprimované.**

Protilátka	Fc receptor	Izoforma receptoru	Afinita k protilátkam	Expresia na bunkách
IgG	FcγRI	FcγRIa	vysoká	monocyty, makrofágy, neutrofilý, eozinofily
		FcγRIb	nízka	monocyty, makrofágy, neutrofilý, krvná doštičky a Langerhansove bunky
	FcγRII	FcγRIIa	nízka	monocyty, makrofágy, neutrofilý
		FcγRIIc	nízka	monocyty, makrofágy, neutrofilý
		FcγRIId	nízka	monocyty, makrofágy, neutrofilý
	FcγRIII	FcγRIIIa	stredná	makrofágy, NK bunky, γδ T bunky, niektoré monocyty
FcγRIIIb		nízka	neutrofilý a eozinofily	
IgE	FcεRI	FcεRI	veľmi vysoká	žírne bunky, bazofily, Langerhansove bunky, aktivované monocyty
		FcεRIa	nízka	B bunky
	FcεRII	nízka	B bunky, T bunky, monocyty, eozinofily, makrofágy	
IgA	FcαRI	FcαRIa	stredná	neutrofilý, monocyty, niektoré makrofágy, eozinofily, Kupfferove bunky a niektoré dendritické bunky

Fc – konštantné oblasti protilátok, Ig – imunoglobulíny, NK – natural killer



**Obr. 2. Proces glykozylácie. Proces glykozylácie začína v endoplazmatickom retikule, kde je štruktúra  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  prenesená z molekuly dolicholilu (A) ukotveného v membráne na asparagín (N) v sekvencii novo syntetizovaného proteínu (B). Postupne je takýto glykoproteín transportovaný do Golgiho aparátu, kde je štruktúra prekursorového glykánu spracovaná na štruktúru  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  s dvomi anténami (C), ktorá tvorí základ všetkých N-glykozylácií. Na toto jadro môžu byť pridávané molekuly galaktózy, fukózy, N-acetylglukózáminu a kyseliny N-acetylneuramínove (D – core-fukozylácia, E – digalaktózovaný glykán, F – bisektinový glykán, G – disialylovaný glykán). Prevzaté a upravené z [9].**

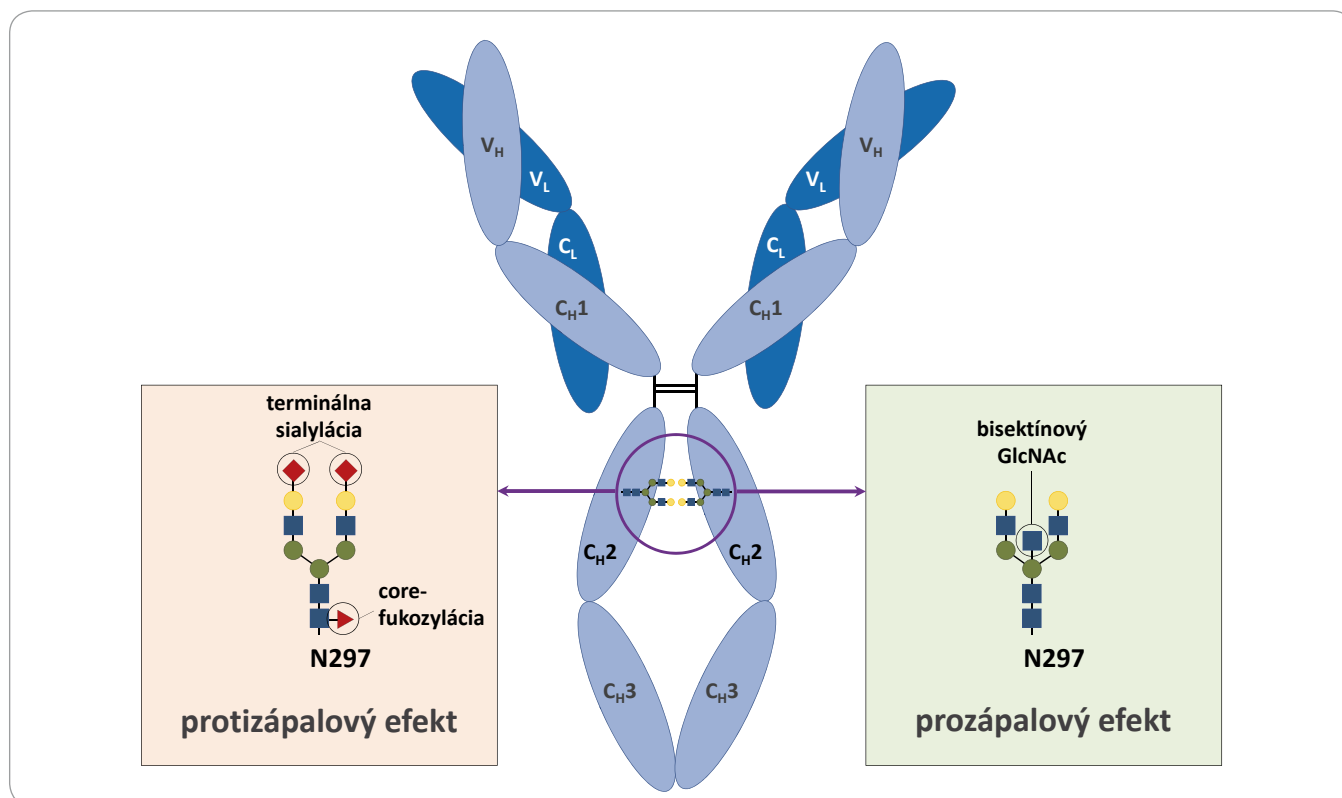
cese odohrávajúcom sa v endoplazmatickom retikule, je oligosacharyltransferázovým komplexom rozoznávaná sekvencia N-X-S(T) a na asparagín (N) prenesená oligosacharidová zložka so zložením  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (glukóza – Glc, manóza – Man, N-acetylglukózámin – GlcNAc). Takto modifikovaný pro-

teín prechádza do Golgiho aparátu, kde je štruktúra glykánu postupne spracovávaná špecifickými glykozidázami a glykosyltransferázami. Finálny glykoproteín je sekretovaný mimo bunku [9,10]. Existuje veľké množstvo molekúl N-glykánov, ktorými sú proteíny modifikované. Jej základ pozostáva však vždy z dvoch

molekúl GlcNAc a troch manózových jednotiek (obr. 2).

### Glykozylácia IgG

IgG tvoria približne 75 % z celkového množstva ľudských sérových protilátok a rovnako sú prevažujúcou skupinou používaných a vyvíjaných protilátok



Obr. 3. Ilustrácia konzervovanej glykozylácie IgG v pozícii N297 a príklady vplyvov odlišných štruktúr na efektorové funkcie IgG. Obrázok popisuje vplyv zloženia glykozylácie na zápalovú odpoveď. Zatiaľ čo je terminálnej sialylácii a core-fukozylácii je pripisovaný protizápalový, bisektínové glykány majú prozápalový efekt na pôsobenie IgG. Prevzaté a upravené z [21].

IgG – imunoglobulíny triedy G

využívaných v terapii rôznych ochorení [11]. Zásadný efekt na funkciu IgG má N-glykozylácia oblasti Fc. Tieto oblasti totiž interagujú s receptormi FcγR nachádzajúcimi sa na ďalších imunitných bunkách [12] a deglykozylácia Fc vedie k takmer úplnej strate väzby s receptormi FcγRI [13]. Ľudské IgG obsahujú na svojom Fc len jedinú konzervovanú pozíciu glykozylácie nachádzajúce sa na C<sub>H</sub>2 doméne na asparagínu v pozícii 297 (N297) (obr. 3) [14]. I keď sú štruktúry Fc glykánov IgG pomerne heterogénne [15], oproti ostatným glykoproteínom tvoria len dvojtantenárne štruktúry, ktoré môžu byť obohatené ďalšími molekulami sacharidov ovplyvňujúcich štruktúrne i funkčné vlastnosti IgG, ako jej stabilitu alebo typ FcγR, na ktoré sa viažu [16]. α-1,6 anténa glykánu totiž nekovalentne interaguje s Fc reťazcom, zatiaľ čo druhá anténa (α-1,3) smeruje do priestoru medzi reťazcami a tam interaguje s rovnakým ramenom glykánu druhého ťažkého reťazca, čo sta-

bilizuje štruktúru protilátky [17]. V minulosti sa na základe kryštalografických dát predpokladalo, že táto glykozylácia vytvára otvorenú konformáciu Fc oblasti, zatiaľ čo absencia glykozylácie viedla k zatvorenej konformácii, ktorá nie je schopná interakcie s receptormi [18,19]. Neskôr bol však tento model vyvrátený experimentami s protilátkami v roztoku a bolo preukázané, že neglykozylované Fc fragmenty sú flexibilné a môžu vytvárať ešte otvorenejšie konformácie [20].

Ako už bolo spomenuté, základná štruktúra glykánu (GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>2</sub>) môže byť modifikovaná molekulami iných sacharidov, konkrétne galaktózy (Gal), kyseliny neuramínovej (NeuAc), fukózy (Fuc) alebo ďalšími molekulami GlcNAc a Man [21]. U zdravých jedincov sú najčastejšími štruktúrami negalaktózylovaná štruktúra (IgG-G0), monogalaktózylovaná štruktúra (IgG-G1) a digalaktózylovaná štruktúra (IgG-G2) tvoriace väčšinu glykoforiem IgG [22,23]. Viaceré štúdie poukazujú, že terminálna

galaktozylácia je modulátorom zápalovej aktivity IgG, keď bolo zistené, že absencia terminálnej galaktózy pôsobí prozápalovo prostredníctvom aktivácie komplementu alternatívnou cestou [24]. Pokles hladiny galaktozylovaných glykoforiem bol naopak zaznamenaný u viacerých ochorení, ako reumatoidnej artritídy či lupus erythematosus [25–27]. Štúdia autorov Karsten et al na myších modeloch poukazuje na to, že galaktozylácia Fc oblasti je nevyhnutná pre efektívne spustenie protizápalovej signálnej kaskády interakciou s FcγRIIB receptorom [28]. O prozápalovom pôsobení terminálnych galaktozylácií však hovoria ďalšie výsledky. Cez afinitu k C1q zložke komplementu podporujú CDC a väzbou aktivujúcich FcγR receptorov taktiež ADCC [29]. Tieto kontrastujúce výsledky poukazujú na komplexnosť signálnych dráh imunitných reakcií sprostredkovaných protilátkami. Napojenie ďalšieho typu sacharidu – kyseliny neuramínovej v procese sialylácie – tak-

tiež vedie k významnej modifikácii pre reguláciu zápalovej aktivity IgG [30,31]. Predpokladá sa, že práve sialylované glykoformy majú význam pre protizápalovú aktivitu intravenózneho imunoglobulínu (intravenous immunoglobulin – IVIg) indikovaného pri mnohých imunodeficientných, neurologických a ďalších ochoreniach [32,33]. U zdravých jedincov je sialylácia (mono- a disialylácia) na rozdiel od galaktozylácie málo abundančná, vyskytujúca sa na približne u 10–15 % glykoforiem IgG [11]. Naopak fukozylácia prvej molekuly GlcNAc, ktorou sa glykán viaže na proteín (core-fukozylácia), sa u ľudskej populácie vyskytuje v približne 90 % prípadoch. Takéto štruktúry dokážu viazať receptory FcγRIII až 100násobne slabšie a znižujú tak cytotoxickú aktivitu takýchto IgG najmä pri ADCC [34,35]. Funkcia fukozylácie je pravdepodobne regulačná, vytvára stericke prekážky pre naviazanie receptorov, a tak zabraňuje aktivácii prozápalových procesov pri fyziologických podmienkach (obr. 3) [36,37].

Opačné pôsobenie, i keď v menšej miere, bolo popísané u bisektínových glykoforiem IgG (obr. 2 – štruktúra F). Z dôvodu sterickej zábrany, ktorú bisektínový GlcNAc vytvára pre fukozylačný enzým, tieto štruktúry neobsahujú core-fukozyláciu. Nárast ADCC aktivity u bisektínových glykoforiem IgG je tak pripisovaný skôr absencii tejto fukozylácie, ktorá by bola schopná tlmiť ADCC aktivitu IgG [38].

Popri konzervovaných miestach glykozylácie, Fc obsahuje približne 15–25 % sérových IgG i glykozylácie Fab oblastí [39]. Sú to hlavne komplexné bianténarne N-glykány napojené na N-X-S/T sekvencie, ktoré vznikli v procese hypermutácií [40]. V porovnaní s Fc tvoria glykánové štruktúry Fab z veľkej časti bisektínové, galaktozylované či sialylované glykány a naopak menšie množstvo core-fukozylovaných [41]. Lepšia dostupnosť týchto štruktúr pre glykozyltransferázy oproti stericke bráneným Fc glykánom na C<sub>H</sub>2 doméne vedie k vzniku rozmanitejších štruktúr. Rovnako sú tieto glykozylácie dostupnejšie i prostrediu a môžu rovnako významne ovplyvňovať stabilitu, biologický polčas rozpadu či väzobné vlastnosti protilátky [42–44].

### Glykozylácie ďalších typov protilátok

I keď je IgG najlepšie preštudovanou izoformou protilátok, niekoľko faktov je známych aj o glykozylácii ďalších izotypov. Protilátky IgE hrajú významnú úlohu v alergických reakciách. IgE sa dokáže viazať na receptory FcεRI žírnych buniek a FcεRII B-buniek [45] a na rozdiel od IgG obsahujú IgE niekoľko glykozylačných miest. Štyri konzervované glykozylácie (tri komplexné a jedna vysokomanózová) sa nachádzajú na Fc a ďalšie tri glykozylačné miesta s komplexnými glykánmi sa nachádzajú na Fab [46,47]. Efekty glykozylácií IgE protilátok boli preukázané mutáciami, ktoré blokovali glykozylácie v popísaných pozíciách [48]. Mutácia konzervovanej pozície N394 na Fc, ktorá zodpovedá konzervovanej glykozylácii N297 u IgG, redukuje väzbu na receptor FcεRI [49]. Opačný efekt majú glykozylácie IgE na ich väzbu na receptory B-lymfocytov FcεRII, keď absencia glykozylácie vedie k zvýšeniu tejto väzby [50].

Glykozylácia IgA, ktorá má zásadnú úlohu v mukózne imunitě, je závislá na ich izotype [51]. Existujú dve izofomy protilátky IgA: IgA1 a IgA2, u druhého rozoznávame dva allotypy IgA2m(1) a IgA2m(2). U izotypu IgA1, ktorý tvorí približne 85 % celkového IgA, sú známe dve konzervované miesta N-glykozylácie modifikované komplexnými glykánmi N263 a N459 [52]. Mimo toho bola popísaná O-glykozylácia až v šiestich pozíciách v oblasti spájajúcich Fab a Fc. Tieto glykozylácie hrajú úlohu vo väzbe mikroorganizmov sekretovanými IgA [15]. Taktiež bola popísaná úloha glykozylácie IgA v patogenézi nefropatie [53]. Oba subizotypy IgA2 obsahujú štyri glykozylačné miesta N166, N263, N337, N459, subizotyp IgA2m(2) má navyše jedno miesto v pozícii N211 [15]. IgM, ktoré sú prvou skupinou protilátok produkovaných po vystavení antigénu, tvoria penta- alebo hexamérne štruktúry, ktoré sú silno glykozylované. Obsahujú päť N-glykozylačných miest obsadených tromi komplexnými a dvomi oligomanózovými štruktúrami [54]. Nedávne štúdie zaznamenali vplyv sialylácie na imunitnú aktivitu IgM moduláciou interakcie s T-lymfocytmi [55].

Protilátky IgD sú najmenej abundantným izotypom, obsahujú však taktiež konzervované glykozylácie. Sú u nich identifikované tri N-glykozylácie nutné pre ich správnu konformáciu a sekréciu a podobne ako IgA1 obsahujú aj O-glykánové modifikácie [56]. I keď sú miesta konzervovaných glykozylácií u týchto izotypov pomerne dobre popísané, je potrebné odhaliť ich konkrétne vplyvy na funkciu týchto protilátok.

### Regulácia glykozylácie a jej fyziologické a patologické zmeny

Pravdepodobne existuje niekoľko mechanizmov, ktoré vplyvajú na glykozyláciu protilátok, zahrnujúc expresiu glykozyltransferáz resp. glykozidáz, dostupnosti jednotlivých sacharidových substrátov, pH vnútri Golgiho aparátu, rýchlosť syntézy proteínov a dostupnosti vezikulárneho transportného aparátu. Zaznamenanie zmeny glykozylačného profilu IgG v závislosti na faktoroch, akými sú vek, pohlavie či tehotenstvo, poukazujú taktiež na vplyv hormonálneho riadenia týchto procesov. Bolo zistené, že trend rastu galaktozylovaných glykoforiem sa v období medzi 20. a 30. rokom života obracia a začína klesať [57–59]. Tento proces je signifikantný najmä u žien na začiatku menopauzy [60–62]. Redukcia agalaktozylovaných glykoforiem je kontrastne pozorovaná v tehotenstve, kde bol súbežne popísaný mierny pokles fukozylovaných glykoforiem protilátok. U tehotných pacientok s reumatoídnou artritídou nárast galaktozylovaných glykoforiem koreloval so zlepšením zdravotného stavu [63,64].

I keď je glykozylácia vysoko konzervovaným procesom, existuje niekoľko analýz, ktoré poukazujú na ich aktívne zmeny v procesoch zápalových odpovedí u autoimunitných a infekčných ochorení [65–68]. Taktiež boli zaznamenané zmeny v mnohých nádorových ochoreniach. Pomerne uniformne bol zachytený pokles galaktozylácie u mnohopočetného myelómu, nádoroch žalúdka, hrubého čreva, prostaty, pľúc a ďalších nádorov korelujúci s progresiou a metastázovaním [69–73]. Tento trend je vysvetlený vplyvom zápalovej reakcie na vývoj nádoru alebo stra-

**Tab. 2. Príklady protilátok obsahujúcich glykozyláciu schválených pre terapiu onkologických ochorení. Tabuľka popisuje obchodný názov, štruktúru, mechanizmus ich pôsobenia a ochorenia, pri ktorých sa využívajú.**

Protilátka	Obchodný názov	Zloženie	Mechanizmus účinku	Využitie v onkológii	Referencie
rituximab	Rituxan	IgG1 κ chimerické	väzba transmembránového proteínu CD20 B-lymfocytov a ich lýza, ADCC, CDC	non-Hodgkinov lymfóm, chronická lymfocytová leukémia	[109,110]
bevacizumab	Avastin	IgG1 κ humanizované	väzba a blokácia signálnej dráhy VEGF	kolorektálny karcinóm, HER2 negatívne metastázujúce nádory prsu, nemalobunečný karcinóm pľúc	[111–113]
denosumab	Xgeva	IgG2 κ ľudské	väzba a blokácia signálnej dráhy RANKL	metastázy kostnej drene	[114]
daratumumab	Darzalex	IgG1 κ ľudské	väzba CD38 a inhibícia rastu nádorových buniek a indukcia apoptózy, ADCC, CDC	mnohopočetný myelóm	[115]
cetuximab	Erbix	IgG1 κ chimerické	väzba na EGFR a blokácia dráhy, inhibícia rastu nádorových buniek rastu a tvorby metastáz, ADCC	metastázujúci kolorektálny karcinóm, metastázujúce nemalobunčné karcinómy hlavy a krku	[116,117]
trastuzumab emtansine	Kadcyla	IgG1 κ humanizované + liečivo	väzba IV podjednotky receptora HER2, endocytóza a uvoľnenie DM1 blokujúceho funkciu mikrotubulov, ADCC	metastázujúce nádory prsu	[118,119]
avelumab	Bavencio	IgG1 λ ľudské	väzba PD-L1 a blokácia imunosupresívnych signálov, ADCC	metastázujúci karcinóm z Merkelových buniek	[120]
pertuzumab	Perjeta	IgG1 κ humanizované	väzba dimerizačnej podjednotky receptora HER2, ADCC	metastázujúce nádory prsu	[121,122]
necitumumab	Portrazza	IgG1 κ ľudské	väzba a blokovanie signálnej dráhy EGFR, ADCC	metastázujúci skvamózny nemalobunečný karcinóm pľúc	[123,124]
pembrolizumab	Keytruda	IgG4 κ humanizované	väzba receptora PD-1 a blokácia imunosupresívnych signálov	metastázujúci melanóm, metastázujúce nádory krčku maternice, metastázujúci nemalobunečný karcinóm pľúc	[125–127]
cemiplimab	Libtayo	IgG4 κ ľudské	väzba receptora PD-1 a blokácia imunosupresívnych signálov	metastázujúci kožný skvamózny karcinóm	[128,129]

Ig – imunoglobulín, ADCC – bunková cytotoxicita závislá na protilátkach, CDC – cytotoxicita závislá na komplemente, VEGF – vascular endothelial growth factor, RANKL – receptor activator of NFκB ligand, HER2 – human epidermal growth factor receptor 2, PD-L1 – programmed death-ligand 1, PD1 – programmed cell death protein 1

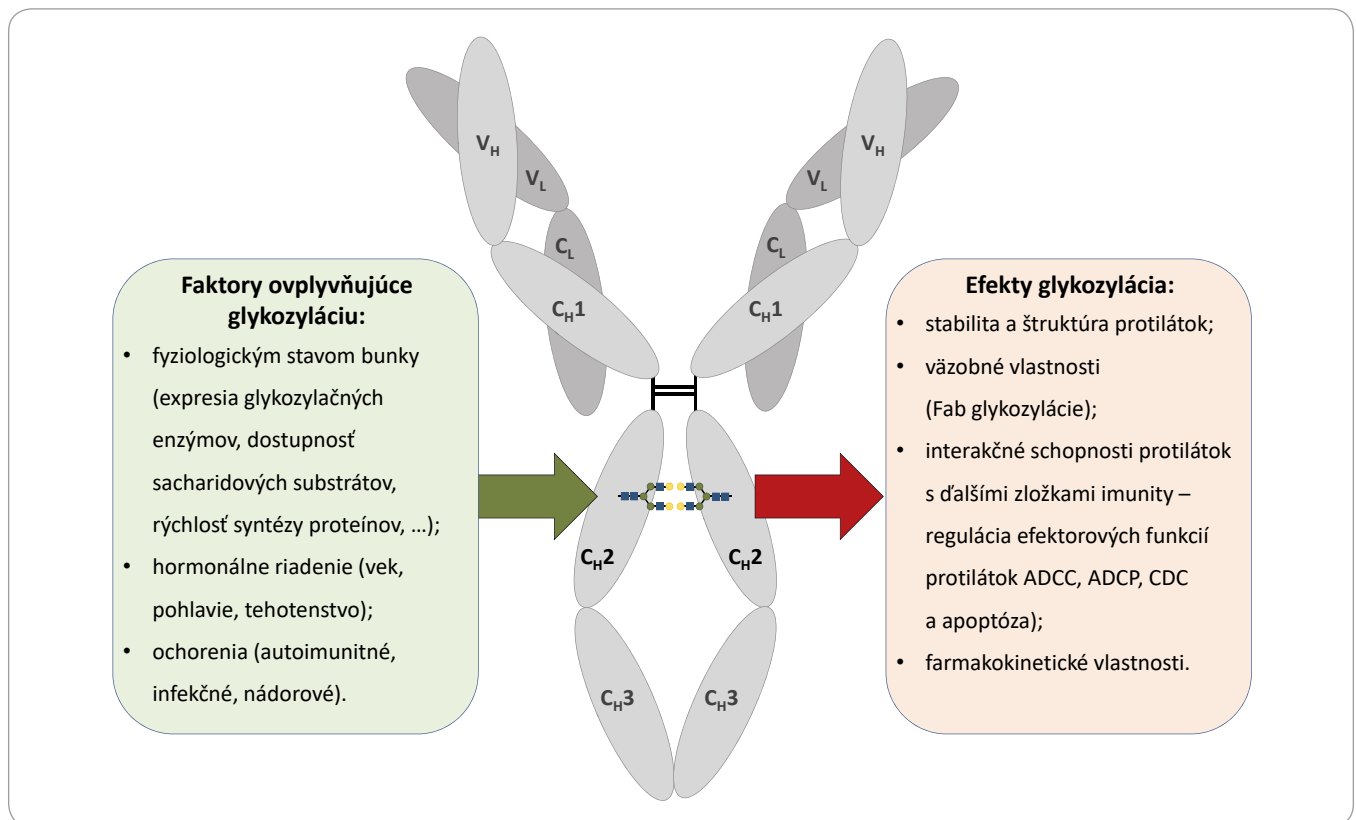
tou schopnosti takýchto IgG viazať C1q, a možnosťou nádorových buniek uniknúť CDC [74]. Popri galaktozylácii boli zaznamenané zmeny aj u iných glykoforiem. U nádorov žalúdka bol zachytený nárast fukozylovaných IgG a naopak pokles bisektínových IgG. V jednej štúdií bola taktiež zistená asociácia zvýšenia sialylovaných a bisektínových glykoforiem IgG s lepším prežitím [70]. Štúdie na veľkom počte subjektov (pacientov

a zdravých kontrol) potvrdili pokles sialylácie v celkovom sérovom IgG spojený s vývojom nádoru a horšou prognózou [75,76]. Nárast podielu manózy u IgG Fc a Fab asociovaný s progresiou ochorenia bol zachytený u malígneho melanómu v porovnaní so zdravými pacientmi. Niektoré práce poukazujú na koreláciu profilu agalaktózových glykoforiem s hladinami zavedených biomarkerov vývoja nádorového ochore-

nia a metastázovania, ako je to u nádoru prostaty, pľúc a žalúdka. Navrhujú tak zaradenie hladín týchto špecifických glykozylácií ako ďalších biomarkerov pre zlepšenie diagnostiky nádorových ochorení do budúcnosti [72,77,78].

### Terapeutické protilátky

Vývoj monoklonálnych protilátok je jednou z najrýchlejšie sa vyvíjajúcich oblastí terapeutík [79]. S presadzovaním cieľ-



**Obr. 4. Faktory ovplyvňujúce glykozyláciu protilátok a efekty týchto glykozylácií na štruktúru a funkciu protilátok.**

Fab – fragment viažajúci antigén, ADCC – bunková cytotoxicita závislá na protilátkach, ADCP – bunková fagocytóza závislá na protilátkach, CDC – cytotoxicita závislá na komplemente

nej terapie rastie ponuka efektívnejších protilátok ako hlavných zástupcov biologickej liečby využiteľných pre čoraz širšie spektrum ochorení, čo podčiarkuje aj trend zvyšovania počtu pre terapiu schválených protilátok v posledných rokoch. V roku 2017 tento počet prvýkrát stúpol počet v EÚ a USA na dvojciferné číslo (10) [80]. V novembri roku 2018 to bolo už 12 protilátok a ďalšie 4 boli v procese schvaľovania [81]. Glykozylácia ako modifikácia, ktorá významne vplyva na kvalitu protilátok, patrí k základným parametrom, ktoré je nutné analyzovať pri vývoji a produkcii biosimilárnych terapeutík [82] (tab. 2).

V mnohých prípadoch je produkcia monoklonálnych protilátok pre terapiu z hľadiska glykozylácie komplikovaná. Ako bolo spomenuté, väčšina Fc fragmentov ľudských IgG obsahuje komplexné bianténarne G0F, G1F a G2F s core-fukozyláciou a stopovými množstvami sialylovaných glykoforiem [83]. Pri produkcii protilátok v CHO bunkách

(izolovaných z čínskeho škrečka) sú vytvárané glykoformy prirodzene sa vyskytujúce na ľudskom IgG [84]. Myšie myelómové bunky (NS0 a SP2/0) však dokážu na rozdiel od CHO buniek pridať abnormálne sacharidy, ako N-glykolylnauramínovú kyselinu, ktoré môžu pôsobiť imunogénne [85]. Tieto odlišnosti v spektre glykoforiem však nemožno brať len ako problém. Myšia myelómová bunková línia YB2/0 dokáže produkovať rekombinantné protilátky s nízkym obsahom core-fukozylácie, čo môže mať za následok až 50násobne vyššiu ADCC aktivitu oproti produkcii v CHO bunkách [38]. Takisto kvasinky nedokážu vytvárať fukozylované štruktúry, ale zato tvoria hlavne vysokomanóзовé štruktúry, ktorých profil sa líši v závislosti na kmeni [86,87]. Vďaka genetickej modifikácii dokážu byť pre produkciu terapeutických Ig využité aj rastliny, kde boli vypnuté enzýmy tvoriace imunogénne glykoformy [88]. A tak ako je pre zníženie imunogénnosti nutná humanizácia

ich proteínovej zložky, sú v expresných systémoch pomocou génového inžinierstva vypnuté enzymatické dráhy tvoriace takéto glykoformy a naopak zosilnené dráhy tvoriace glykoformy s požadovanými vlastnosťami [89,90].

Významným parametrom terapeutických protilátok je ich farmakokinetika. V tomto procese je dôležitým mechanizmom najmä ich vychytávanie z obehu. Tento dej reguluje ich koncentráciu a tým pádom aj samotnú efektívitu terapie. Vychytávanie glykozylovaných protilátok je sprostredkovaný niekoľkými proteínmi viažajúcimi oligosacharidy (receptormi). K najvýznamnejším patria v pečeni exprimovaný asialoglykoproteínový receptor (asialoglycoprotein receptor – ASGPR) a manóзовý receptor (manose receptor – ManR) [91,92]. ASGPR rozoznáva terminálnu galaktozyláciu bi-, tri- a tetraantenárnych glykoproteínov, zatiaľ čo ManR interaguje s oligomanóзовými a hybridnými glykánmi (glykány obsahujúce manóзовé a komplexné an-

tény). Glykoproteíny sú po väzbe endocytované a lyzované [93–95]. Ukázalo sa, že pre predĺženie dĺžky biologickej účinnosti glykoproteínov je významná terminálna sialylácia, ktorá blokuje alebo aspoň významne znižuje väzbu glykánov a teda aj protilátok na tieto receptory [96]. Samotná glykozylácia N297 u IgG nie je výraznejšie významná z hľadiska farmakokinetiky. Ako bolo spomenuté, sú to najčastejšie G0 resp. G1 štruktúry a nevykazujú silnejšiu afinitu k ASGPR [97,98]. Signifikantnejšie efekty na vychytávanie protilátok cez ich glykanové modifikácie však môžu vykazovať Fab glykozylácie, a to v závislosti na ich pozícii a sacharidovom zložení [43, 99].

Problémom využitia CHO a myších buniek sú protilátky, ktoré obsahujú vysoký podiel vysokomanozových glykoforiem [100]. Autori Goetze et al poukázali na to, že ich množstvo je z krvi odbúrané výrazne rýchlejšie a selektívne oproti glykoformám obsahujúcim terminálnu galaktózu alebo GlcNAc, ktoré si zachovávali konštantnú hladinu počas 34 dní po podaní [101]. To je spôsobené ManR receptormi makrofágov a dendritických buniek a aktiváciou dráhy manan viažajúceho lektínu [102].

### Neglykozylované protilátky

V terapii však nemajú miesto len glykozylované protilátky. Pri liečbe niektorých ochorení protilátkami bez glykozylácie, akými sú napr. onartuzumab (MetMAB – používaný pri liečbe nemalobunkového karcinómu pľúc) alebo orelizumab (TRXA – diabetes mellitus typ 1), nie sú požadované aktivácie ADCC/CDC efektívnych funkcií, ale len neutralizácia, resp. anti/agonistické pôsobenie [103,104]. Neglykozylované protilátky majú porovnateľné dĺžky biologickej účinnosti ako glykozylované, ich výhodou je však rýchlejšia produkcia nižšími eukaryotmi alebo baktériami [105]. V prípade špecifických substitúcií v C<sub>H</sub>2 a/alebo C<sub>H</sub>3, ako napr. S298G/T299A, si dokážu zachovať schopnosť väzby určitých FcγR receptorov, ktorá je inak závislá na glykozyláci [106,107].

### Záver

Protilátky nie sú len nevyhnutnými komponentami nášho imunitného systému,

ale aj modernými nástrojmi terapie závažných ochorení. Glykozylácie protilátok významne vplývajú na ich funkciu (obr. 4). Medzi tieto procesy zaraďujeme najmä apoptózu, ADCC, ADCP či CDC. Obrovské množstvo zložiek, ktoré imunitný systém tvorí, však vytvára spletnosť signálnych dráh, a preto stále nie je poznanie ich presnej funkcie v prirodzených i v patologických procesoch dostatočne definované. Po odhalení funkcií jednotlivých glykozylácií či už za fyziologických alebo patologických podmienok bude umožnené navrhovať protilátky alebo aj Fc-fúzané preparáty [108] s glykozyláciami zabezpečujúcimi ešte cieľnejšiu a efektívnejšiu terapiu.

### Literatúra

- Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, antibodies, and more. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11(1): 137–154. doi: 10.2215/CJN.09430915.
- Woof JM, Burton DR. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(2): 89–99. doi: 10.1038/nri1266.
- Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (Suppl 2): S41–S52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- Sela-Culang I, Kunik V, Ofra Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. *Front Immunol* 2013; 4: 302. doi: 10.3389/fimmu.2013.00302.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(2): 239–245. doi: 10.1016/j.coi.2007.01.005.
- Jennewein MF, Alter G. The immunoregulatory roles of antibody glycosylation. *Trends Immunol* 2017; 38(5): 358–372. doi: 10.1016/j.it.2017.02.004.
- Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2014; 15(8): 707–716. doi: 10.1038/ni.2939.
- Mohorko E, Glockshuber R, Aebi M. Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J Inher Metab Dis* 2011; 34(4): 869–878. doi: 10.1007/s10545-011-9337-1.
- Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(11): 2430–2437. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.001.
- Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. N-glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al (eds). *Essentials of Glycobiology*. New York: Cold Spring Harbor 2015: 99–111.
- Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2017; 6(9): 576–588. doi: 10.1002/psp4.12224.
- Hayes JM, Wormald MR, Rudd PM et al. Fc gamma receptors: glycobiology and therapeutic prospects. *J Inflamm Res* 2016; 9: 209–219. doi: 10.2147/JIR.S121233.
- Jefferis R, Lund J. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγA: current models. *Immunol Lett* 2002; 82(1–2): 57–65. doi: 10.1016/s0165-2478(02)00019-6.
- Huhn C, Selman MH, Ruhaak LR et al. IgG glycosylation analysis. *Proteomics* 2009; 9(4): 882–913. doi: 10.1002/pmic.200800715.
- Arnold JN, Wormald MR, Sim RB et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 21–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702.

- Dekkers G, Treffers L, Plomp R et al. Decoding the human immunoglobulin G-glycan repertoire reveals a spectrum of Fc-receptor and complement-mediated effector activities. *Front Immunol* 2017; 8: 877. doi: 10.3389/fimmu.2017.00877.
- Li W, Zhu Z, Chen W et al. Crystallizable fragment glycoengineering for therapeutic antibodies development. *Front Immunol* 2017; 8: 1554. doi: 10.3389/fimmu.2017.01554.
- Krapp S, Mimura Y, Jefferis R et al. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol* 2003; 325(5): 979–989. doi: 10.1016/s0022-2836(02)01250-0.
- Ahmed AA, Giddens J, Pincetic A et al. Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *J Mol Biol* 2014; 426(18): 3166–3179. doi: 10.1016/j.jmb.2014.07.006.
- Borrok MJ, Jung ST, Kang TH et al. Revisiting the role of glycosylation in the structure of human IgG Fc. *ACS Chem Biol* 2012; 7(9): 1596–1602. doi: 10.1021/cb300130k.
- Shade KT, Anthony R. Antibody glycosylation and inflammation. *Antibodies* 2013; 2(3): 392–414. doi: 10.3390/antib2030392.
- Butler M, Quelhas D, Critchley AJ et al. Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis. *Glycobiology* 2003; 13(9): 601–622. doi: 10.1093/glycob/cwg079.
- Huffman JE, Pucic-Bakovic M, Klaric L et al. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13(6): 1598–1610. doi: 10.1074/mcp.M113.037465.
- Banda NK, Wood AK, Takahashi K et al. Initiation of the alternative pathway of murine complement by immune complexes is dependent on N-glycans in IgG antibodies. *Arthritis Rheum* 2008; 58(10): 3081–3089. doi: 10.1002/art.23865.
- Go MF, Schrohenloher RE, Tomana M. Deficient galactosylation of serum IgG in inflammatory bowel disease: correlation with disease activity. *J Clin Gastroenterol* 1994; 18(1): 86–87. doi: 10.1097/00004836-199401000-00021.
- Gudelj I, Salo PP, Trbojevic-Akmacic I et al. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864(6): 2034–2039. doi: 10.1016/j.bbdis.2018.03.018.
- Tomana M, Schrohenloher RE, Reveille JD et al. Abnormal galactosylation of serum IgG in patients with systemic lupus erythematosus and members of families with high frequency of autoimmune diseases. *Rheumatol Int* 1992; 12(5): 191–194.
- Karsten CM, Pandey MK, Figge J et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIIb and dextrin-1. *Nat Med* 2012; 18(9): 1401–1406. doi: 10.1038/nm.2862.
- Peschke B, Keller CW, Weber P et al. Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves c1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Front Immunol* 2017; 8: 646. doi: 10.3389/fimmu.2017.00646.
- Anthony RM, Ravetch JV. A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 2010; 30 (Suppl 1): S9–S14. doi: 10.1007/s10875-010-9405-6.
- Seeling M, Bruckner C, Nimmerjahn F. Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13(10): 621–630. doi: 10.1038/nrrheum.2017.146.
- Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol* 2013; 13(3): 176–189. doi: 10.1038/nri3401.



33. Böhm S, Schwab I, Lux A et al. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. *Semin Immunopathol* 2012; 34(3): 443–453. doi: 10.1007/s00281-012-0308-x.
34. Shields RL, Lai J, Keck R et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ3 and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002; 277(30): 26733–26740. doi: 10.1074/jbc.M202069200.
35. Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fcγ3 and functional polymorphism. *Clin Cancer Res* 2004; 10(18 Pt 1): 6248–6255. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0850.
36. Ferrara C, Grau S, Jager C et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fcγ3 and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(31): 12669–12674. doi: 10.1073/pnas.1108455108.
37. Scanlan CN, Burton DR, Dwek RA. Making autoantibodies safe. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(11): 4081–4082. doi: 10.1073/pnas.0801192105.
38. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 2003; 278(5): 3466–3473. doi: 10.1074/jbc.M210665200.
39. van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T et al. The emerging importance of IgG Fc glycosylation in immunity. *J Immunol* 2016; 196(4): 1435–1441. doi: 10.4049/jimmunol.1502136.
40. Dunn-Walters D, Boursier L, Spencer J. Effect of somatic hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable regions. *Mol Immunol* 2000; 37(3–4): 107–113. doi: 10.1016/S0161-5890(00)00038-9.
41. Anumula KR. Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *J Immunol Methods* 2012; 382(1–2): 167–176. doi: 10.1016/j.jim.2012.05.022.
42. Wright A, Tao MH, Kabat EA et al. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J* 1991; 10(10): 2717–2723.
43. Coloma MJ, Trinh RK, Martinez AR et al. Position effects of variable region carbohydrate on the affinity and in vivo behavior of an anti-(1→6) dextran antibody. *J Immunol* 1999; 162(4): 2162–2170.
44. Leibiger H, Wustner D, Stigler RD et al. Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem J* 1999; 338(2): 529–538.
45. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012; 18(5): 693–704. doi: 10.1038/nm.2755.
46. Dorrington KJ, Bennich HH. Structure-function relationships in human immunoglobulin E. *Immunol Rev* 1978; 41: 3–25.
47. Arnold JN, Radcliffe CM, Wormald MR et al. The glycosylation of human serum IgD and IgE and the accessibility of identified oligomannose structures for interaction with mannan-binding lectin. *J Immunol* 2004; 173(11): 6831–6840. doi: 10.4049/jimmunol.173.11.6831.
48. Young RJ, Owens RJ, Mackay GA et al. Secretion of recombinant human IgE-Fc by mammalian cells and biological activity of glycosylation site mutants. *Protein Eng* 1995; 8(2): 193–199.
49. Nettleton MY, Kochan JP. Role of glycosylation sites in the IgE Fc molecule. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107(1–3): 328–329. doi: 10.1159/000237017.
50. Vercelli D, Helm B, Marsh P et al. The B-cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* 1989; 338(6217): 649–651. doi: 10.1038/338649a0.
51. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol* 2011; 4(6): 590–597. doi: 10.1038/mi.2011.39.
52. Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 2005; 206: 64–82. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00290.x.
53. Novak J, Julian BA, Mestecky J et al. Glycosylation of IgA1 and pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Immunopathol* 2012; 34(3): 365–382. doi: 10.1007/s00281-012-0306-z.
54. Moh ES, Lin CH, Thaysen-Andersen M et al. Site-specific N-glycosylation of recombinant pentameric and hexameric human IgM. *J Am Soc Mass Spectrom* 2016; 27(7): 1143–1155. doi: 10.1007/s13361-016-1378-0.
55. Colucci M, Stockmann H, Butera A et al. Sialylation of N-linked glycans influences the immunomodulatory effects of IgM on T cells. *J Immunol* 2015; 194(1): 151–157. doi: 10.4049/jimmunol.1402025.
56. Takahashi N, Tetaert D, Debuire B et al. Complete amino acid sequence of the delta heavy chain of human immunoglobulin D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(9): 2850–2854. doi: 10.1073/pnas.79.9.2850.
57. Pucić M, Knezevic A, Vidic J et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10(10): M111. doi: 10.1074/mcp.M111.010090.
58. Kapur R, Kustiawan I, Vestreim A et al. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood* 2014; 123(4): 471–480. doi: 10.1182/blood-2013-09-527978.
59. Menni C, Keser T, Mangino M et al. Glycosylation of immunoglobulin: role of genetic and epigenetic influences. *PLoS One* 2013; 8(12): e82558. doi: 10.1371/journal.pone.0082558.
60. Krištić J, Vučković F, Menni C et al. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69(7): 779–789. doi: 10.1093/gerona/glt190.
61. Ercan A, Kohrt WM, Cui J et al. Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. *JCI Insight* 2017; 2(4): e89703. doi: 10.1172/jci.insight.89703.
62. Ruhaak LR, Uh HW, Beekman M et al. Decreased levels of bisecting GlcNAc glycoforms of IgG are associated with human longevity. *PLoS One* 2010; 5(9): e12566. doi: 10.1371/journal.pone.0012566.
63. van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH et al. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(6): R193. doi: 10.1186/ar2892.
64. Bondt A, Selman MH, Deelder AM et al. Association between galactosylation of immunoglobulin G and improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy is independent of sialylation. *J Proteome Res* 2013; 12(10): 4522–4531. doi: 10.1021/pr400589m.
65. Novokmet M, Lukic E, Vuckovic F et al. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep* 2014; 4: 4347. doi: 10.1038/srep04347.
66. Troelsen LN, Jacobsen S, Abrahams JL et al. IgG glycosylation changes and MBL2 polymorphisms: associations with markers of systemic inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2012; 39(3): 463–469. doi: 10.3899/jrheum.110584.
67. Pezer M, Stambuk J, Perica M et al. Effects of allergic diseases and age on the composition of serum IgG glycome in children. *Sci Rep* 2016; 6: 33198. doi: 10.1038/srep33198.
68. de Jong SE, Selman MH, Adegnik AA et al. IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation. *Sci Rep* 2016; 6: 28207. doi: 10.1038/srep28207.
69. Mittermayr S, Le GN, Clarke C et al. Polyclonal immunoglobulin G N-glycosylation in the pathogenesis of plasma cell disorders. *J Proteome Res* 2017; 16(2): 748–762. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00768.
70. Kodar K, Stadlmann J, Klaamas K, Sergeyev B, Kurtenkov O. Immunoglobulin G Fc N-glycan profiling in patients with gastric cancer by LC-ESI-MS: relation to tumor progression and survival. *Glycoconj J* 2012; 29(1): 57–66. doi: 10.1007/s10719-011-9364-z.
71. Bones J, Mittermayr S, O'Donoghue N et al. Ultra performance liquid chromatographic profiling of serum N-glycans for fast and efficient identification of cancer associated alterations in glycosylation. *Anal Chem* 2010; 82(24): 10208–10215. doi: 10.1021/ac102860w.
72. Kanoh Y, Mashiko T, Danbara M et al. Analysis of the oligosaccharide chain of human serum immunoglobulin G in patients with localized or metastatic cancer. *Oncology* 2004; 66(5): 365–370. doi: 10.1159/000079484.
73. Arnold JN, Saldova R, Galligan MC et al. Novel glycan biomarkers for the detection of lung cancer. *J Proteome Res* 2011; 10(4): 1755–1764. doi: 10.1021/pr101034t.
74. Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F et al. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* 2008; 9(11): 1225–1235. doi: 10.1038/ni.1655.
75. Vuckovic F, Theodoratou E, Thaci K et al. IgG glycome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22(12): 3078–3086. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1867.
76. Theodoratou E, Thaci K, Agakov F et al. Glycosylation of plasma IgG in colorectal cancer prognosis. *Sci Rep* 2016; 6: 28098. doi: 10.1038/srep28098.
77. Kanoh Y, Ohara T, Tadano T et al. Changes to N-linked oligosaccharide chains of human serum immunoglobulin G and matrix metalloproteinase-2 with cancer progression. *Anticancer Res* 2008; 28(2A): 715–720.
78. Qian Y, Wang Y, Zhang X et al. Quantitative analysis of serum IgG galactosylation assists differential diagnosis of ovarian cancer. *J Proteome Res* 2013; 12(9): 4046–4055. doi: 10.1021/pr4003992.
79. Beck A, Wurch T, Bailly C et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(5): 345–352. doi: 10.1038/nri2747.
80. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2018. *MAbs* 2018; 10(2): 183–203. doi: 10.1080/19420862.2018.1415671.
81. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *MAbs* 2019; 11(2): 219–238. doi: 10.1080/19420862.2018.1556465.
82. Kirchoff CF, Wang XM, Conlon HD et al. Biosimilars: key regulatory considerations and similarity assessment tools. *Biotechnol Bioeng* 2017; 114(12): 2696–2705. doi: 10.1002/bit.26438.
83. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog* 2005; 21(1): 11–16. doi: 10.1021/bp400101j.
84. Raju S. Glycosylation variations with expression systems and their impact on biological activity of therapeutic immunoglobulins. *BioProcess International* 2003; 1: 44–53.
85. Yoo EM, Chintalacharuvu KR, Penichet M et al. Myeloma expression systems. *J Immunol Methods* 2002; 261(1–2): 1–20. doi: 10.1016/S0022-1759(01)00559-2.
86. Liu CP, Tsai TI, Cheng T et al. Glycoengineering of antibody (Herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(4): 720–725. doi: 10.1073/pnas.1718172115.
87. Li H, Sethuraman N, Stadheim TA et al. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* 2006; 24(2): 210–215. doi: 10.1038/nbt1178.
88. Durocher Y, Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(6): 700–707. doi: 10.1016/j.copbio.2009.10.008.
89. Ha S, Wang Y, Rustandi RR. Biochemical and biophysical characterization of humanized IgG1 produced in *Pichia pastoris*. *MAbs* 2011; 3(5): 453–460. doi: 10.4161/mabs.3.5.16891.

90. Sehn LH, Assouline SE, Stewart DA et al. A phase 1 study of obinutuzumab induction followed by 2 years of maintenance in patients with relapsed CD20-positive B-cell malignancies. *Blood* 2012; 119(22): 5118–5125. doi: 10.1182/blood-2012-02-408773.
91. Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 1982; 51: 531–554. doi: 10.1146/annurev.bi.51.070182.002531.
92. Mi Y, Lin A, Fiete D et al. Modulation of mannose and asialoglycoprotein receptor expression determines glycoprotein hormone half-life at critical points in the reproductive cycle. *J Biol Chem* 2014; 289(17): 12157–12167. doi: 10.1074/jbc.M113.544973.
93. Baenziger JU, Fiete D. Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes. *Cell* 1980; 22(2 Pt 2): 611–620. doi: 10.1016/0092-8674(80)90371-2.
94. Park EI, Manzella SM, Baenziger JU. Rapid clearance of sialylated glycoproteins by the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 2003; 278(7): 4597–4602. doi: 10.1074/jbc.M210612200.
95. Taylor ME, Drickamer K. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 1993; 268(1): 399–404.
96. Zhou Q, Qiu H. The mechanistic impact of N-glycosylation on stability, pharmacokinetics, and immunogenicity of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2019; 108(4): 1366–1377. doi: 10.1016/j.xphs.2018.11.029.
97. Liu L, Stadheim A, Hamuro L et al. Pharmacokinetics of IgG1 monoclonal antibodies produced in humanized *Pichia pastoris* with specific glycoforms: a comparative study with CHO produced materials. *Biologicals* 2011; 39(4): 205–210. doi: 10.1016/j.biologicals.2011.06.002.
98. Leabman MK, Meng YG, Kelley RF et al. Effects of altered Fcγ<sub>3</sub>R binding on antibody pharmacokinetics in cynomolgus monkeys. *MAbs* 2013; 5(6): 896–903. doi: 10.4161/mabs.26436.
99. Endo T, Wright A, Morrison SL et al. Glycosylation of the variable region of immunoglobulin G-site specific maturation of the sugar chains. *Mol Immunol* 1995; 32(13): 931–940. doi: 10.1016/0161-5890(95)00078-s.
100. Mimura Y, Katoh T, Saldova R et al. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell* 2018; 9(1): 47–62. doi: 10.1007/s13238-017-0433-3.
101. Goetze AM, Liu YD, Zhang Z et al. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology* 2011; 21(7): 949–959. doi: 10.1093/glycob/cwr027.
102. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM et al. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med* 1995; 1(3): 237–243.
103. Ju MS, Jung ST. Aglycosylated full-length IgG antibodies: steps toward next-generation immunotherapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 2014; 30: 128–139. doi: 10.1016/j.copbio.2014.06.013.
104. Jung ST, Kang TH, Kelton W et al. Bypassing glycosylation: engineering aglycosylated full-length IgG antibodies for human therapy. *Curr Opin Biotechnol* 2011; 22(6): 858–867. doi: 10.1016/j.copbio.2011.03.002.
105. Simmons LC, Reilly D, Klimowski L et al. Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J Immunol Methods* 2002; 263(1–2): 133–147. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00036-4.
106. Sazinsky SL, Ott RG, Silver NW et al. Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(51): 20167–20172. doi: 10.1073/pnas.0809257105.
107. Jung ST, Reddy ST, Kang TH et al. Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind Fcγ<sub>3</sub>R potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(2): 604–609. doi: 10.1073/pnas.0908590107.
108. Jafari R, Zolbanan NM, Rafatpanah H et al. Fc-fusion proteins in therapy: an updated view. *Curr Med Chem* 2017; 24(12): 1228–1237. doi: 10.2174/0929867324666170113112759.
109. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2003; 63(8): 803–843. doi: 10.2165/00003495-200363080-00005.
110. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 2010; 47(2): 115–123. doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.01.011.
111. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2335–2342. doi: 10.1056/NEJMoa032691.
112. Velcheti V, Viswanathan A, Govindan R. The proportion of patients with metastatic non-small cell lung cancer potentially eligible for treatment with bevacizumab: a single institutional survey. *J Thorac Oncol* 2006 Jun; 1(5): 501.
113. von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(4): 299–309. doi: 10.1056/NEJMoa1111065.
114. Gibiansky L, Sutjandra L, Doshi S et al. Population pharmacokinetic analysis of denosumab in patients with bone metastases from solid tumours. *Clin Pharmacokinet* 2012; 51(4): 247–260. doi: 10.2165/11598090-00000000-00000.
115. de Weers M, Tai YT, van der Veer MS et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol* 2011; 186(3): 1840–1848. doi: 10.4049/jimmunol.1003032.
116. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007; 357(20): 2040–2048. doi: 10.1056/NEJMoa071834.
117. Bonner JA, Harari PM, Giralt J et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354(6): 567–578. doi: 10.1056/NEJMoa053422.
118. Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res* 2014; 16(2): 209. doi: 10.1186/bcr3621.
119. Verma S, Miles D, Gianni L et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 367(19): 1783–1791. doi: 10.1056/NEJMoa1209124.
120. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of a novel anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells. *Cancer Immunol Res* 2015; 3(10): 1148–1157. doi: 10.1158/2326-6066.CCR-15-0059.
121. Nahta R, Hung MC, Esteva FJ. The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(7): 2343–2346.
122. Swain SM, Baselga J, Kim SB et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(8): 724–734. doi: 10.1056/NEJMoa1413513.
123. Dienstmann R, Tabernero J. Necitumumab, a fully human IgG1 mAb directed against the EGFR for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11(12): 1434–1441.
124. Garnock-Jones KP. Necitumumab: first global approval. *Drugs* 2016; 76(2): 283–289. doi: 10.1007/s40265-015-0537-0.
125. Ribas A, Hamid O, Daud A et al. Association of pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. *JAMA* 2016; 315(15): 1600–1609. doi: 10.1001/jama.2016.4059.
126. Borcoman E, Le Tourneau C. Pembrolizumab in cervical cancer: latest evidence and clinical usefulness. *Ther Adv Med Oncol* 2017; 9(6): 431–439. doi: 10.1177/1758834017708742.
127. Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 378(22): 2078–2092. doi: 10.1056/NEJMoa1801005.
128. Markham A, Duggan S. Cemiplimab: first global approval. *Drugs* 2018; 78(17): 1841–1846. doi: 10.1007/s40265-018-1012-5.
129. Migden MR, Rischin D, Schmulds CD et al. PD-1 blockade with cemiplimab in advanced cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2018; 379(4): 341–351. doi: 10.1056/NEJMoa1805131.