



УДК 547.995.1.03:57.083.3

## ГЛИКОКОНЬЮГАТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИАКРИЛАМИДА – ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЛЕКТИНОВ, АНТИТЕЛ, ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ В ГЛИКОБИОЛОГИИ, ЦИТОХИМИИ И ГИСТОХИМИИ

© 1996 г. Н. В. Бовин

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Михлухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 02.02.96 г.

Обзор посвящен аналогам гликоконъюгатов клетки человека – неогликоконъюгатам – их синтезу, физико-химическим характеристикам, а также применению в качестве инструментов исследования углеводсвязывающих молекул. Разработан подход к синтезу полиакриламидных производных углеводов, основанный на взаимодействии полностью активированной полиакриловой кислоты с ω-аминоалкилгликозидами. Новый метод дает высокую воспроизводимость результатов, оказался методически проще известных методов синтеза таких производных. Метод значительно расширил синтетические возможности: с его помощью можно получать не только молекулы типа Sug-полимер, но и конъюгаты, несущие различные метки и эффекторы, а также липофильные производные, сорбенты, гликоповерхности и т.д. В первой части описан синтез полиакриламидных конъюгатов и их физико-химические свойства, во второй – синтез усложненных “конструкций”, включая псевдогликопротеины, псевдомуцины, гликочастицы и гликоповерхности; одновременно даются примеры применения описываемых конъюгатов в различных областях гликобиологии. Обсуждаются перспективы дальнейшего развития представленного направления в гликотехнологии и медицине.

*Ключевые слова:* углеводы, гликоконъюгаты, полиакриламид, лектины, антитела, гликозилтрансферазы, иммуноанализ, цитохимия, гистохимия.

Гетерогенность природных гликоконъюгатов, особенно гликопротеинов, осложняет их применение в качестве инструментов исследования углеводсвязывающих молекул, поэтому особую и подчас незаменимую роль в области гликобиологии играют синтетические аналоги гликоконъюгатов. Химический синтез позволяет нарабатывать олигосахариды в индивидуальном состоянии и необходимом количестве, но, что существеннее, дает также возможность направленно модифицировать биомолекулы, когда это требуется, для усиления биологического эффекта, выбора одной активности из их спектра, введения метки, придания устойчивости по отношению к ферментам и т.д. Без преувеличения можно утверждать, что разнообразие структур синтетических анало-

гов и возможности модификации ограничиваются только степенью фантазии синтетика.

Особенностью углевод-белкового и углевод-углеводного узнавания является то, что высокая аффинность и специфичность биоузнавания достигаются за счет поливалентного (многоточечного) взаимодействия, при этом на уровне единичного взаимодействия аффинность может быть предельно низкой или вообще не регистрироваться [1, 2]. Обнаруживать, изучать, моделировать многоточечные кооперативно протекающие процессы удобно с помощью поливалентных гликоконъюгатов (неогликоконъюгатов) с заранее заданными свойствами (молекулярной массой, растворимостью, гибкостью матрицы, устойчивостью, расстоянием между углеводными лигандами и т.д.). Для того чтобы синтезировать конъюгаты с заранее заданными составом и свойствами, необходим метод, позволяющий присоединять лиганды к матрице с гарантированным количественным выходом – лишь при этом условии можно обеспечить нужное содержание и соотношение лигандов. Перечисленным критериям отвечает реакция аминоалкилгликозидов с активированной полиакриловой кислотой [3, 4], приводящая к

Использованы сокращения: Av – авидин, Biot – d-биотин, Bp – бензил, BSA – бычий сывороточный альбумин, CMP – цитидинмонофосфат, Flu – флуоресцентная метка, GMDP – глюкозаминилмураомилдипептид, MDP – мураомилдипептид, NC – нитроцеллюлоза, OS – олигосахарид, PA – полиакриловая кислота, PAA – полиакриламид, PE – фосфатидилэтаноламин, PHAA – поли(2-гидроксиэтилакриламид), PNPA – поли(4-нитрофенилакрилат), PO – пероксидаза из хрена, sp – спейсер, Str – стрептавидин, Sug – моно- или олигосахаридный остаток, связанный со спейсерной группой.

N-замещенным полиакриламидам. Данный обзор впервые суммирует работы, посвященные свойствам и биоаналитическому применению гликоконъюгатов полиакрилатного типа, синтезированных с помощью указанного подхода.

### СИНТЕЗ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА УГЛЕВОД-АКРИЛАТНЫХ КОНЪЮГАТОВ

Известны два принципиально различных подхода к синтезу гликозилированных полиакриламидов: конденсация аминоксилгликозидов с активированной полиакриловой кислотой [3–7] и полимеризация гликозидов, содержащих акрильную группу в составе спейсера [8–16]. Главной отличительной особенностью первого подхода, обсуждаемого в данном обзоре, является универсальность: по единой принципиальной схеме (рис. 1) можно получать такие неогликоконъюгаты, как псевдополисахариды, зонды с разными типами меток, неогликолипиды, сорбенты и более сложные конструкции [5, 7].

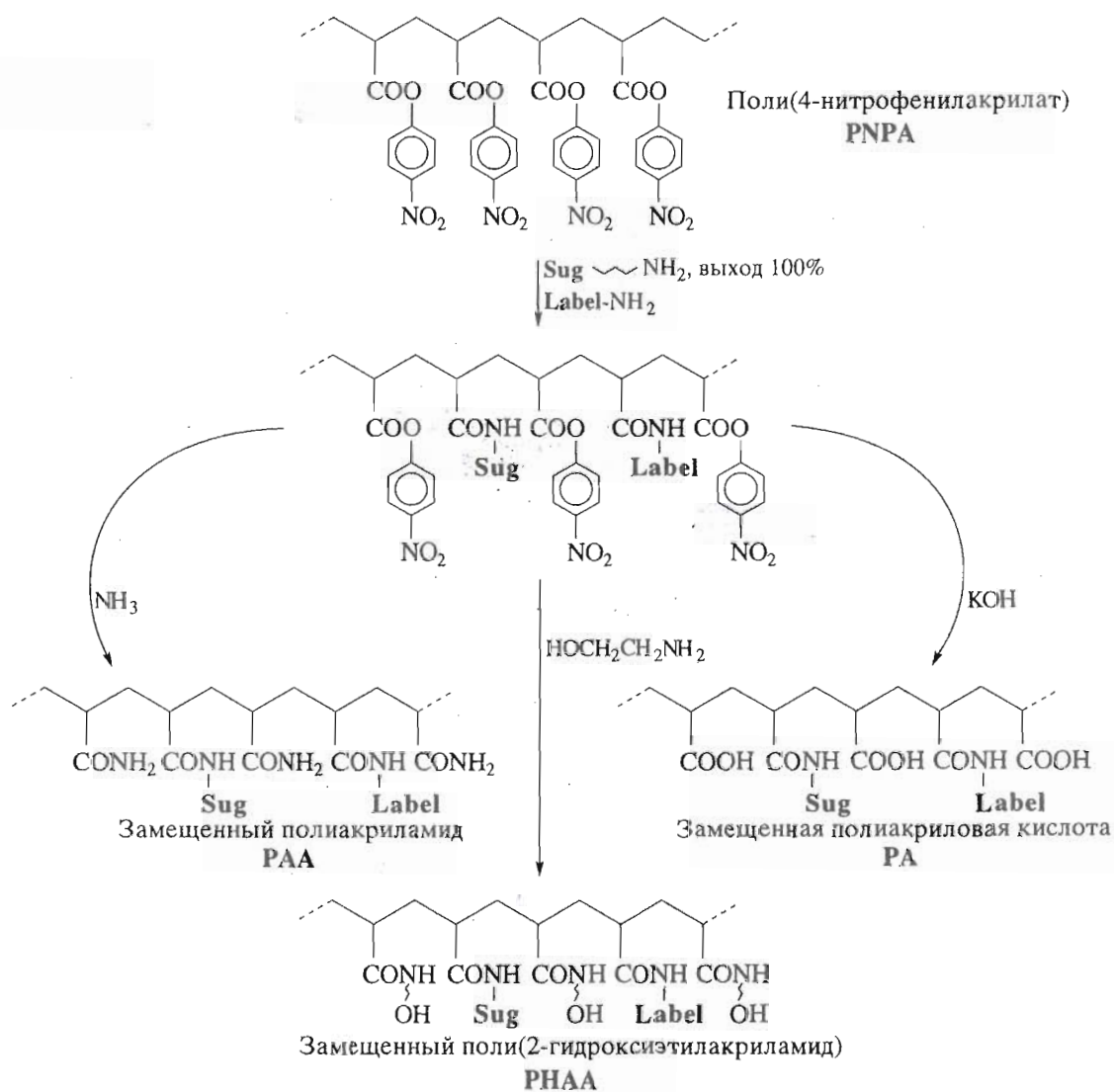
Обычно при конъюгации углеводов лигандов с готовой матрицей-носителем электрофилом является присоединяемый лиганд (сахарид), а нуклеофилом – матрица [17]; при таком подходе неизбежны побочные реакции, в частности распад и сольволиз электрофила и, как следствие, потеря части сахаридного лиганда. В обсуждаемой схеме, напротив, нуклеофильный компонент – это присоединяемый лиганд, а электрофильный – матрица. В такой “обращенной” системе лиганд не вступает в побочные реакции и количественно присоединяется к матрице. Чтобы конденсация проходила не только количественно, но и достаточно быстро, желателен избыток активированных групп по отношению к лиганду-нуклеофилу, что достигается тотальной активацией всех карбоксильных групп полимера. Таким образом, исходным соединением в синтезе конъюгатов является полностью активированная полиакриловая кислота.

**Синтез активированных полимеров.** Попытки активировать полиакриловую кислоту или ее сополимеры при помощи N-гидроксисукцинимиды, 4-нитрофенола или пентафторфенола в присутствии карбодиимидов приводили к очень невысоким степеням активации (не более 10%). Поэтому активацию проводили на стадии мономера, т.е. синтезировали активированный эфир акриловой кислоты и уже его полимеризовали, получая полностью активированную полиакриловую кислоту, т.е. поли(4-нитрофенилакрилат) (PNPA). Радикальную полимеризацию 4-нитрофенилакрилата [5, 7, 18] можно проводить как на 100-мг, так и на 10-г количествах мономера, при этом характеристики полученных полимеров идентичны и

воспроизводимы. Независимо от молекулярной массы полимер хорошо растворим в DMF и DMSO – удобных растворителях для последующей конденсации.

**Конденсация поли(4-нитрофенилакрилата) с ω-аминоалкилгликозидами.** То, что в исходных полимерах все карбоксильные группы активированы, дает широкие возможности для дальнейшей их модификации соединениями, имеющими первичную аминогруппу (рис. 1). Полное замещение нитрофеноксигрупп на аминоксилгликозидные не идет, однако в пределах задаваемой 25–30% модификации реакция проходит количественно. Как правило, для биологических исследований использовались конъюгаты с 5–20% мольным замещением [5], оставшийся “запас” активированных групп в полимере позволял проводить конденсацию с дополнительными (неуглеводными) аминами, причем второй амин (обычно метка) также присоединялся количественно. Введение аминоксилганда в пределах задаваемых 15–20 мол. % (под мольным процентом здесь и далее имеется в виду мольная доля модифицированных лигандом акрилатных звеньев) идет количественно в присутствии триэтиламина или диизопропилэтиламина при комнатной температуре, для более высоких степеней замещения требуется нагревание до 40–50°C. В DMF реакция идет быстрее, чем в DMSO, критерий качества растворителей лишь один – отсутствие примесей первичных или вторичных аминов; следы воды в растворителе не сказываются на течении реакции. Предельно возможное количество введенного сахара зависит от его размера: для объемистых три- и тетрасахаридов в описанных условиях верхний предел находится в области 30–35 мол. %, а мольная доля вводимого моносахарида может достигать 30%. Полноту присоединения легко контролировать при помощи ТСХ, проявляя непрореагировавший амин гингидрином, что реально позволяет обнаружить менее 1% от непрореагировавшего RNH<sub>2</sub>. Количественность присоединения показана также и другими методами [5] – спектрофотометрией и анализом моносахаридного состава, а нативность присоединенных олигосахаридов (в том числе сialiрированных) контролируется спектроскопией <sup>13</sup>C-ЯМР (рис. 2 демонстрирует идентичность исходного и присоединенного к полимеру тетрасахаридов).

Природа аминогруппы в составе лиганда (или его спейсера) и длина самого спейсера практически не сказываются на результате присоединения к активированному полимеру. В большинстве цитируемых в обзоре работ спейсерной группой служил 3-аминопропанол: короткий спейсер сводит к минимуму возможные неспецифические взаимодействия. В то же время благодаря гибкости самой полиакриламидной цепи (она фактически



**Рис. 1.** Схема синтеза конъюгатов. Первая стадия: присоединение аминолигандов (Sug-NH<sub>2</sub>, Label-NH<sub>2</sub>) к активированному полимеру (PNPA). Вторая стадия: модификация носителя, приводящая к конъюгату полиакриламидного типа (PAA), конъюгату этаноламинового типа (PHAA) или конъюгату с полиакриловой кислотой (PA).

служит дополнительным спейсером) короткая аминопропильная связка достаточна для взаимодействия олигосахарида со всеми углеводсвязывающими белками – лектинами, антителами или гликозилтрансферазами. Кроме того, в реакцию присоединения к PNPA с теми же результатами вводили гликозиды с 2-аминоэтильным, 4-аминобутильным, 6-аминогексильным, 4-аминофенильным спейсером, а также гликозиламины и N-гликозиды типа Sug-NHCOCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>. Производные последнего типа удобно получать из олигосахаридов, выделенных из природных источников (олигосахаридов молока или N-цепей гликопротеинов, отщепленных от белковой цепи с помощью гидразинолиза или обработки литийборгидридом – см. ниже). Их превращают в гликозиламины, затем хлорацетируют, а на последней стадии действи-

ем аммиака переводят в целевые производные Sug-NHCOCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.

После присоединения к полимеру аминоалкилгликозидов оставшиеся активированные группы необходимо удалить; одновременно можно модифицировать полимерную матрицу. Действием аммиака получали PAA-производные (превращение -COOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> в -CONH<sub>2</sub>), реакцией с этаноламином – производные PHAA (превращение -COOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> в -CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), в присутствии щелочи – производные полиакриловой кислоты (превращение -COOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> в -COOH) (рис. 1). Привнесение отрицательного заряда, а также варьирование заместителя при амидном азоте являются дополнительными возможностями модуляции физико-химических свойств конъюгата; из

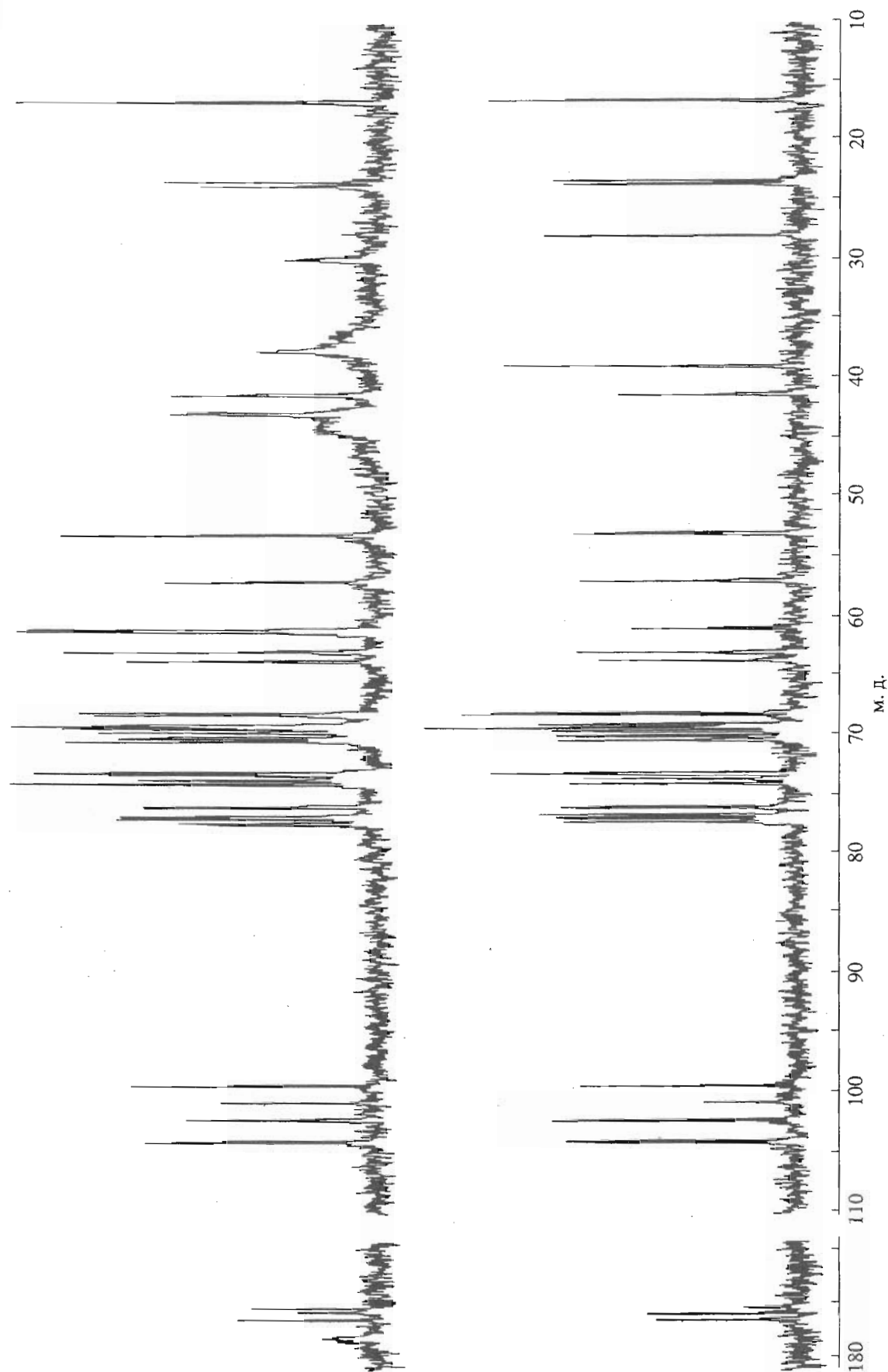


Рис. 2.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр присоединенного к полимеру (вверху) и свободного (внизу) тетрасахарида  $\text{SiLe}^{\text{a}}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 303 K). Все углеводные сигналы сохраняются в конъюгированном тетрасахариде.

перечисленных трех типов наибольшее применение (см. ниже) нашли конъюгаты “этаноламинового типа”, РНАА.

Очистка конъюгата сводится к отделению его от нитрофенола и избытка  $\text{NH}_3$  (или этаноламина) и проводится при помощи гель-фильтрации на TSK-геле или сефадексе LH-20 или переосаждением. В ряде случаев, например когда конъюгат использовался для активации планшетов или нитроцеллюлозных мембран, вообще не требуется никакой очистки, реакционную смесь достаточно разбавить подходящим буферным раствором.

**Молекулярные массы конъюгатов и исходного PNPA.** Кажущиеся молекулярные массы ( $M_r$ ) конъюгатов оценивали двумя способами: 1) гель-хроматографией на различных колонках, в том числе высокоэффективных, с калибровкой по стандартным белковым маркерам, а также декстранам и полиэтиленгликолям; 2) ультрафильтрацией на мембранах с пределом пропускания белков 30, 100 и 300 кДа. Эти способы оценки величины  $M_r$  давали согласующиеся результаты. Степени полимеризации конечных водорастворимых конъюгатов были близки степени полимеризации исходного PNPA, определенной с помощью ВЭЖХ сравнением с полистирольными стандартами [19], что дает основание считать кажущиеся молекулярные массы конъюгатов близкими к реальным. Величины  $M_r$  конъюгатов задавались степенью полимеризации исходного поли(4-нитрофенилакрилата). Из активированного полимера, синтезированного в условиях работы [5], получали биотинилированные зонды и псевдополисахариды типа РНАА ( $M_r$  около 30 кДа), типа РАА ( $M_r$  50 кДа) и типа РА ( $M_r$  80 кДа) (рис. 3, калибровка по белкам-маркерам).

Определяемые молекулярные массы полимеров, модифицированных олигосахаридами, в силу реального увеличения массы были выше, чем у незамещенной матрицы, однако количественной аддитивности массы конъюгата при увеличении степени замещения лигандом не наблюдалось. Расчет показывает, что присоединение трисахарида в количестве 0.2 моль/моль (20 мол. %) должно приводить к увеличению массы конъюгата примерно вдвое, но наблюдаемая величина  $M_r$  отличается всего на 10–20%, что можно объяснить “запаздывающим” увеличением гидродинамического объема молекул даже при значительной нагрузке полимера углеводным лигандом. Реальные размеры конъюгатов были оценены с помощью электронной микроскопии: молекулы имели почти правильную сферическую форму с диаметром около 150 Å, что вполне согласуется с определенным непрямими методами гидродинамическим размером [20].

Следует подчеркнуть принципиальное отличие полиакриламидных гликоконъюгатов от наи-

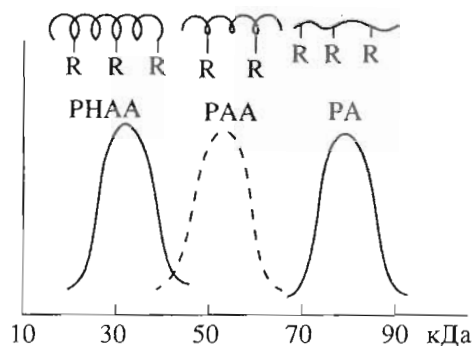


Рис. 3. Относительные молекулярные массы трех типов конъюгатов, имеющих одинаковый углеводный лиганд: РНАА (компактный клубок), РАА (частично развернутый клубок) и РА (сильно развернутый клубок). Вверху: схемы строения молекул, внизу: профили элюции при гель-хроматографии [5].

более популярных сегодня неогликопротеинов с BSA в качестве матрицы. Белок-носитель является жесткой молекулой, олигосахариды присоединены к фиксированному на глобуле аминокислотным остаткам. Полиакриламидный носитель – гибкий клубок, молекула конъюгата “дышит”, расстояния между двумя олигосахаридами в ней не фиксированы, что позволяет конъюгату подстраиваться к рецепторной молекуле или клетке; лишь в сильно “нагруженных” конъюгатах с мольной долей олигосахарида 30% жесткость молекулы благодаря взаимному экранированию цепей возрастает. И еще отличие: доля углеводов в BSA-конъюгатах составляет не более 15 вес. % (например, для 20 остатков трисахарида – около 12%), конъюгат представляет собой большую глобулу с редкими углеводными остатками на поверхности; РНАА-конъюгат напоминает скорее тонкую нить с нанизанными на нее тяжелыми бусинами – весовая доля углеводов может составлять до 80–90% суммарной массы молекулы (рис. 4).

Для большинства биоаналитических задач молекулярная масса конъюгатов порядка 30–50 кДа достаточна и, вероятно, оптимальна. Тем не менее для некоторых целей необходимы значительно большие размеры молекулы. Их получали тремя способами: 1) синтезировали исходный PNPA большей молекулярной массы, чем обычно; 2) гель-хроматографией готового конъюгата, полученного из нефракционированного PNPA, выделяли высокомолекулярную фракцию; 3) молекулы с массой 30–40 кДа с помощью второго полимера сшивали в конъюгаты с  $M_r$  примерно 1000 кДа (подробнее см. ниже).

**Серии конъюгатов с варьируемым содержанием углеводов.** Серии, в которых мольная доля углеводного лиганда плавно меняется (например, 2, 5, 10, 15, 20%), позволяют изучать чувствительность лектина или антитела к плотности лиганда и тем самым выявлять степень кооперативности

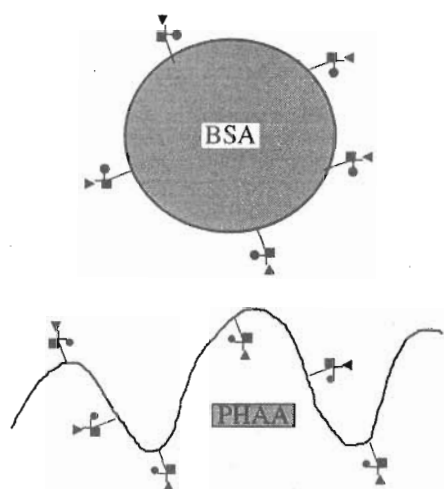


Рис. 4. Схема строения конъюгатов трисахарида с BSA и РНАА.

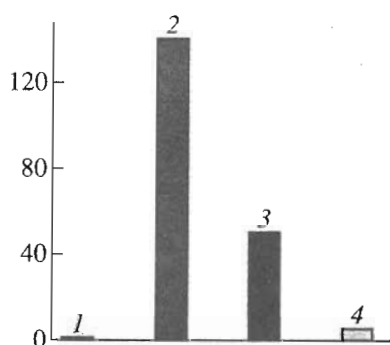


Рис. 5. Относительная ингибирующая активность четырех Neu5Ac-PA с содержанием Neu5Ac (мол. %): 5 (1), 10 (2), 20 (3) и 30 (4). Ингибировалось взаимодействие вируса гриппа A/Texas/1/77 (H3N2) с фетуином в твердофазной системе ИФА. Ингибирующая активность конъюгата (1) принята за 1.

взаимодействия. Увеличение степени нагрузки полимера сахарами (и тем самым уменьшение расстояния между углеводными остатками) далеко не всегда приводит к усилению взаимодействия с комплементарным белком. Так, при взаимодействии конъюгатов Neu5Ac-PA с гемагглютинином вируса гриппа наблюдается резкий максимум активности для 10–12% замещения матрицы, а конъюгаты с содержанием Neu5Ac 5 и 20 мол. % были значительно менее активны [3] (рис. 5).

E-Селектин практически одинаково связывался с конъюгатами SiaLe<sup>x</sup>-РНАА разной степени нагрузки, в то время как некоторые антитела, взаимодействующие с тем же тетрасахаридом SiaLe<sup>x</sup>, аффинно связывались только с конъюгатами, имевшими высокую плотность гаптена [21].

Основываясь на подобного рода данных, можно подбирать оптимальное содержание углеводов для тест-систем. Так, при разработке тест-систем

для выявления антител к группоспецифическому В-трисахариду крови конъюгат Gal $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ -sp-РНАА с 5 мол. % трисахарида оптимален для ИФА, этот конъюгат дает лучшие результаты, чем 10 и 20% конъюгаты. В то же время для выявления антител к структурно очень близкому А-трисахариду GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$  оптимальным оказался конъюгат с содержанием трисахарида 15 мол. % [22].

В аналогичной тест-системе для выявления антител к углеводному эпитопу фенольного гликолипида-I (при диагностировании лепры) конъюгат с 4 мол. % гаптена (остатка 3,6-ди-О-метил-D-глюкопиранозы, DMG) давал лучшую корреляцию с тяжестью заболевания, чем конъюгаты более высокой нагрузки [5], т.е. в данном случае подбор оптимальной нагрузки лиганда дал возможность не только увеличить показатель сигнал/шум, но и улучшить диагностическую специфичность тест-системы. Следует отметить, что специфический эпитоп фенольного гликолипида-I представляет собой трисахарид, содержащий DMG, а для выявления антител к нему оказалось достаточным присоединить к полиакриламидной матрице всего лишь моносахаридный остаток DMG.

Аналогичные результаты получены при разработке диагностикума для выявления антител к стрептококку группы А в сыворотке крови больных. Антигеном в данном случае выступает полисахарид с трисахаридным повторяющимся звеном, к линейному полисахаридному кору присоединены остатки N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамина. Из синтетических аналогов – серии GlcNAc $\beta$ -sp-РНАА с варьируемым содержанием моносахарида – был выбран оптимальный, позволивший разработать практический диагностикум [23]. Как в данном, так и в предыдущем примере только полиакрилатная матрица (но не BSA) в сочетании с подбором оптимальной нагрузки гаптена давала возможность упростить антиген для выявления антител (от трисахарида до моносахарида), причем без ухудшения диагностических характеристик.

В приведенных выше примерах ИФА в качестве твердой фазы обычно использовали полистирол, реже поливинилхлорид, в виде 96-луночных иммунологических планшетов. Полиакриламидные конъюгаты углеводов хорошо сорбируются также и на нитроцеллюлозных пористых мембранах. Это расширяет сферу применения РНАА-конъюгатов в твердофазном анализе, так как нитроцеллюлозная техника в ряде случаев позволяет улучшить чувствительность анализа благодаря значительно большей сорбционной емкости нитроцеллюлозного материала по сравнению с полистиролом. Эта техника хорошо зарекомендовала себя в анализе эпитопной специфичности и кооперативности связывания моноклональных анти-А, анти-В- и анти-Н-антител [24, 25] (т.е. антител

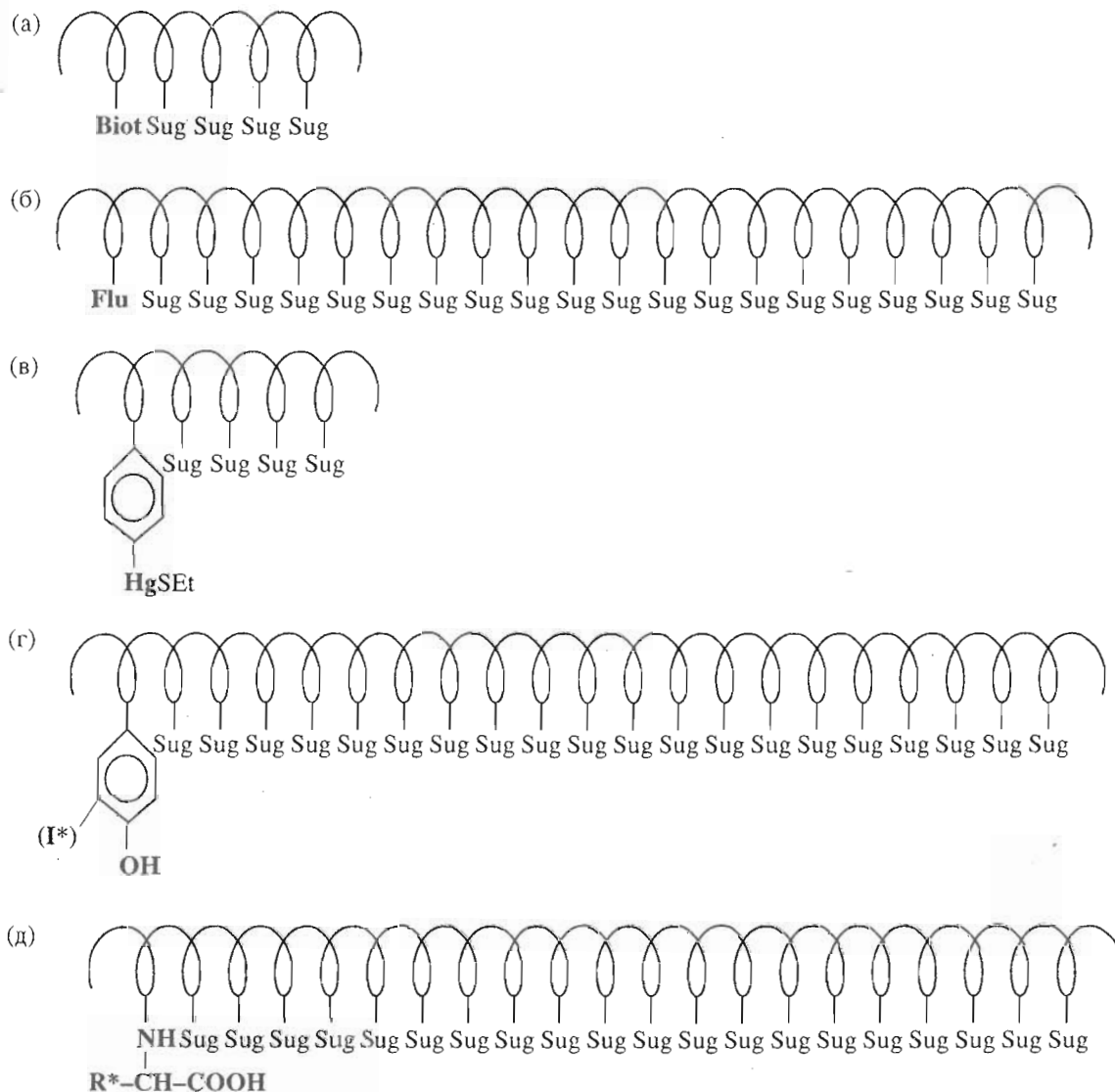


Рис. 6. Схематическое изображение (с учетом соотношения Sug/метка) РНАА-зондов, несущих различные метки: биотиновую (а); флуоресцеиновую или другую флуоресцентную (б); электронно-плотную (в); радиоактивную (г, д): (г) – зонд синтезируется в виде неактивного предшественника, который при необходимости иодируется стандартными методами; (д) – радиоактивная метка, введенная в конъюгат в виде любой активной аминокислоты, содержащей <sup>3</sup>H или <sup>14</sup>C.

против соответствующих группоспецифических антигенов крови), причем позволила получить результаты, отличающиеся от результатов анализа на полистирольных планшетах с использованием тех же серий конъюгатов с переменным содержанием углеводного лиганда и дополняющие их. Способность полиакриламидных конъюгатов связываться с нитроцеллюлозой дала возможность применить также технику иммуноблоттинга при изучении клональной специфичности человеческих антител против группоспецифических трисахаридов А и В. Для переноса анализируемых антител с геля (после электрофореза) брали нитроцеллюлозу, предварительно обработанную конъюгатами РНАА-А или РНАА-В (А и В – груп-

поспецифические трисахариды крови А и В), что позволило проявлять на блоте только антитела, специфические к данному антигену (R. Rieben, неопубликованные результаты).

### КОНЬЮГАТЫ С ДВУМЯ И ТРЕМЯ РАЗНЫМИ ЛИГАНДАМИ

**Гликозонды (второй лиганд – метка).** Для получения углеводных зондов (probes), т.е. реагентов на углеводсвязывающие молекулы, в полимер кроме сахара вводили биотиновую, флуоресцеиновую, электронно-плотную или радиоактивную метку (рис. 6) [5]. Производное биотина (6-аминогексил-амид) вводили в мольной доле 5%, производное

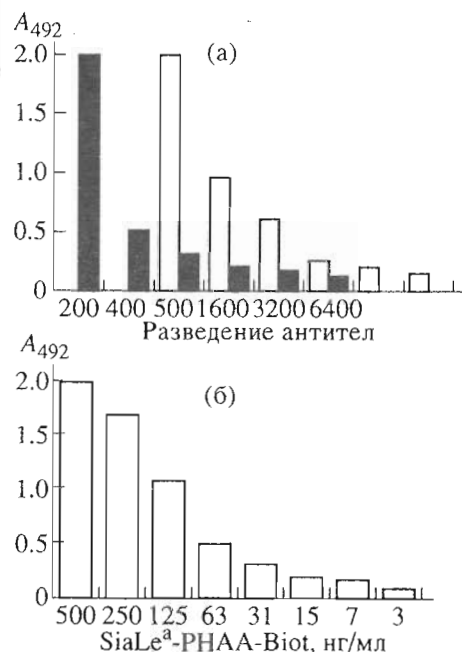


Рис. 7. Сорбция биотинилированного зонда SiaLe<sup>a</sup>-PHAA-Biot (белые столбцы) на 96-луночных полистирольных планшетах: (а) – сравнение с сорбцией небитинилированного (черные столбцы) конъюгата SiaLe<sup>a</sup>-PHAA, “проявление” с помощью моноклональных антител 2D3 (анти-SiaLe<sup>a</sup>); (б) – возможность контроля и оптимизации условий сорбции благодаря биотиновой метке, “проявление” авидин-пероксидазой (О.Е. Галанина, неопубликованные данные).

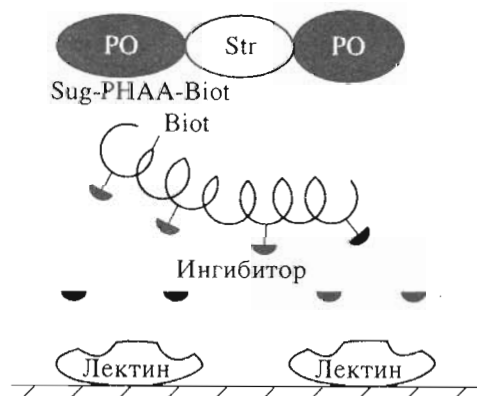


Рис. 8. Схема твердофазного конкурентного метода для исследования специфичности лектинов. Лектин сорбировали на полистирол, затем прибавляли биотинилированный зонд (Sug-PHAA-Biot, Sug изображен в виде перевернутого зонтика) в присутствии ингибитора. Степень связывания зонда измеряли с помощью конъюгата стрептавидина (Str) с пероксидазой (PO).

флуоресцеина (2-аминоэтиламин) – в мольной доле 1%. Относительно низкое содержание меток (по сравнению с 20% содержанием углевода) выбрано для того, чтобы их присутствие не влияло на растворимость зонда и гидрофобный баланс, в то

же время такого количества метки вполне достаточно для обнаружения зонда, связавшегося с клеткой, лектином или антителом. Для электронно-микроскопических исследований (В.Д. Лотте, неопубликованные результаты) к полимеру присоединяли 4-(EtSHg)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>, при исследовании фармакокинетики полиакрилатов использовали радиоактивные метки, которые вводили, либо непосредственно присоединяя к активированному полимеру меченую аминокислоту (рис. бд), либо сначала синтезировали конъюгат с тирамином, а потом вводили иод-127 по фенольным группам (рис. бг).

Углеводные конъюгаты без метки, Sug-РАА, Sug-PHAA (их называют псевдополисахаридами или гликополимерами), являются хорошими сенсibiliзирующими реагентами для ИФА при изучении эпитопной специфичности лектинов и моноклональных антител (см. выше, а также [26–28]). Интересно, что биотинилированные конъюгаты оказались даже более подходящими для сенсibiliзации полистироловых планшетов, чем немеченые соединения, так как благодаря введенному биотину сорбция на пластике улучшается (рис. 7а). Кроме того, биотиновая метка позволяет контролировать реально сорбированное количество реагента с помощью реакции с авидин-пероксидазой (рис. 7б).

В качестве примера твердофазного анализа, где зонд находится не “снизу” (как описано выше), а “сверху”, приведем изучение специфичности очищенного лектина из растения *Butea frondosa* [29]. Прямой вариант, т.е. сорбция углеводного конъюгата с последующим добавлением меченого лектина и ингибитора, в данном случае не сработал из-за сильного неспецифического связывания лектина с полистиролом. Поэтому лектин наносили на пластик, а затем добавляли биотинилированный конъюгат с остатком А-дисахарида GalNAcα1-3Galβ и углеводы-ингибиторы (рис. 8), что дало возможность установить тонкую специфичность обеих форм данного лектина [29].

Аналогичная схема позволила разработать наиболее чувствительную (по сравнению с описанными в литературе [30]) тест-систему для изучения Е-селектина. Интересная особенность данного примера заключается в том, что зонд SiaLe<sup>a</sup>-PHAA-Biot (SiaLe<sup>a</sup> – тетрасахаридный лиганд Е-селектина) применялся в виде предварительно полученного (in situ) комплекса с конъюгатом авидин-пероксидазы [30] (рис. 9).

Конкурентные тест-системы, аналогичные двум описанным, но с антителом вместо лектина, весьма перспективны для диагностики углеводных опухолеассоциированных антигенов, таких, как SiaLe<sup>a</sup> (CA 19-9), Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAc (CA-50) и ганглиозид FucGM<sub>1</sub>. Первое преимущество заключается в возможности определять не



только поливалентные природные антигены, но и моновалентные, такие, как ганглиозиды, в то время как традиционные “сэндвичевые” тест-системы чувствительны только к поливалентным антигенам, так как антитела должны их связать дважды – “снизу” и “сверху”. Второе – только в конкурентной системе природный антиген (не-стандартный и нестабильный) можно адекватно заменить синтетическим.

Наиболее широко зонды данного типа, особенно биотинилированные, применяются для обнаружения и изучения эндогенных клеточных лектинов в гистохимических и цитохимических экспериментах [31–41]. Для ряда важных белков клеточной поверхности, таких, как кластеры дифференцировки и факторы адгезии, либо экспериментально выявлена способность связывать углеводы, либо при анализе аминокислотной последовательности обнаружена область высокой гомологии с углеводузнающими доменами хорошо изученных лектинов. К таким белкам относятся E-, P- и L-селектины, сиалоадгезин, кальмодулин и многие другие [42]. По-видимому, свойство связывать углеводы (лектинность) присуще гораздо более широкому кругу белков, чем принято считать, так как практически все клетки, изученные с помощью зондов типа Sug-PHAA-Biot [34] или аналогичных зондов [43], показали способность специфически связываться с тем или иным моно- или олигосахаридом.

Гисто- или цитохимический углеводный зонд должен удовлетворять нескольким основным требованиям: 1) быть поливалентным, т.е. содержать несколько остатков углеводных лигандов (обычно несколько десятков) на молекуле-носителе, так как константы связывания единичного лиганда с единичным углеводузнающим доменом обычно низки; 2) сама по себе (без углеводного лиганда) молекула носителя не должна связываться с клетками; 3) в составе зонда должна быть метка, удобная для его выявления после связывания с клеткой. Зонды типа Sug-PHAA-Biot и Sug-PHAA-Flu полностью удовлетворяют перечисленным требованиям. Методика цитохимических экспериментов такова [34]: клетки (нативные или мягко зафиксированные формальдегидом) выдерживают с зондом в подходящем буферном растворе, промывают, затем выявляют связавшийся зонд с помощью конъюгата (стрепт)авидин-пероксидаза; по интенсивности окрашивания клеток судят о степени связывания углеводного лиганда, по числу окрашенных клеток данного вида – о специфичности связывания для данного вида, а по характеру распределения окрашивания – о локализации лектина. Выводы о специфичности связывания (о наличии на данных клетках лектина или группы лектинов, связывающихся с данным углеводом) делали, сравнивая связывание клеток с группой зондов, а также проводя ингиби-

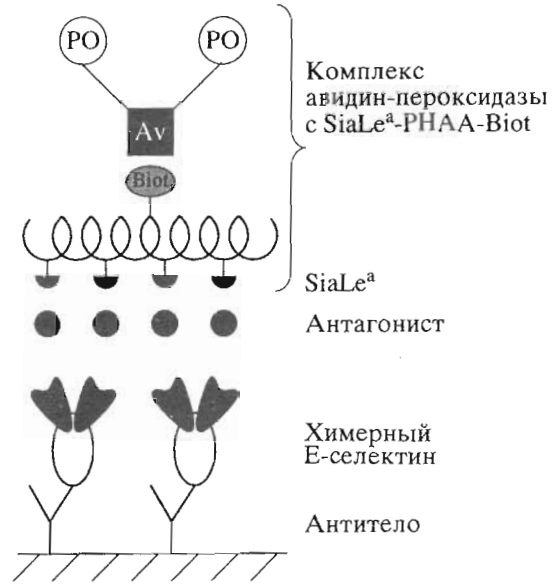


Рис. 9. Схема твердофазного конкурентного ИФА для скрининга антагонистов E-селектина. Антитела к E-селектину сорбировали на пластик с последующим добавлением E-селектина. Последний специфически взаимодействует с зондом SiaLe<sup>a</sup>-PHAA-Biot (благодаря тому, что SiaLe<sup>a</sup> – лиганд селектина), который предварительно закомплексован с авидин-пероксидазой. Если исследуемое вещество (изображено как шарик) взаимодействует с селектином (является его антагонистом или агонистом), регистрируется уменьшение специфического сигнала.

рование связывания низкомолекулярным углеводом. Способность связываться с теми или иными клетками (тканями) выявлена у большинства из 30 синтезированных зондов [31–41]. В качестве углеводных лигандов выступали остатки моносахаридов (-Glc $\alpha$ , -Glc $\beta$ , -Gal $\alpha$ , -Gal $\beta$ , -Man $\alpha$ , -Fuc $\alpha$ , -GlcNAc $\beta$ , -GalNAc $\alpha$ , -GalNAc $\beta$ , -Rha $\alpha$ , -Neu5Ac $\alpha$ , -6PMan $\alpha$ , -3HSO<sub>3</sub>Gal $\beta$ ), группоспецифические антигены крови (ABH, Lewis, i, P), антигены дифференцировки (Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>), рецепторы селектинов (SiaLe, HSO<sub>3</sub>Le), опухолеассоциированные антигены (TF, T $\beta$  $\beta$ , T $\alpha$  $\alpha$ , Fs, SiaLe<sup>a</sup>), углеводы с иммуномодулирующими свойствами (MDP, GMDF, N-цепи  $\alpha$ <sub>1</sub>-кислого гликопротеина).

С помощью данного набора зондов изучались нормальные и трансформированные (как лейкоэмические, так и карциномные) клетки, в основном человеческие. Цель этих работ [31–41] заключалась в поиске количественной и качественной разницы между нормальными и опухолевыми клетками в их способности связывать сложные углеводные молекулы. Ранее широко изучалась способность эндогенных лектинов клеток человека связывать моносахаридные зонды, обычно типа Sug-BSA-метка [44, 45], и лишь на нескольких примерах было показано их связывание с

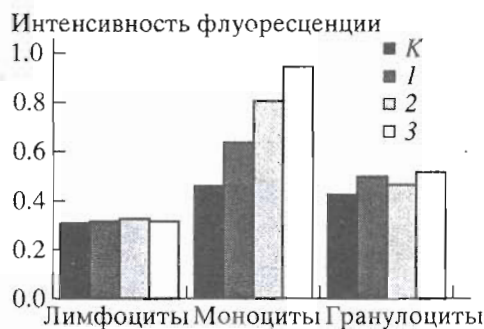


Рис. 10. Исследование взаимодействия зонда  $\text{SiaLe}^x$ -PHAA-Flu (5 (1), 10 (2), 20 мкг (3)) с популяциями клеток крови с помощью проточного цитофлуориметра. Флуоресцентная метка позволяет измерять количество клеток в популяции, специфически связывающих зонд (С.Д. Шиян, С.В. Хайдуков, неопубликованные данные). Контролями (К) служили зонды  $\text{Glc}\beta$ -PHAA-Flu или  $\text{Neu5Ac}$ -PHAA-Flu или  $\text{Le}^x$ -PHAA-Flu.

олигосахаридами [46–51]. С помощью зондов типа Sug-PHAA-Biot, где Sug – остатки более 20 различных олигосахаридов, было показано, что связывание клеточных лектинов с олигосахаридами – явление общего характера. Прежде всего следует отметить, что связывание зондов Sug-PHAA-Biot с клетками было специфическим – в экспериментах по прямому связыванию различные типы клеток крови предпочитали те или иные зонды. Кроме того, связывание зондов ингибировалось соответствующими низкомолекулярными сахарами, но не ингибировалось близкородственными. Так, зонд с остатком дисахарида  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  (TF) взаимодействовал с клетками P-338 и EL-4 (мышинные), а также клетками из миндалин человека; связывание ингибировалось только дисахаридной структурой  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$  в  $\alpha$ -конфигурации ( $\alpha$ -бензил- и  $\alpha$ - $\text{CF}_3\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -гликозиды), значительно хуже – свободным дисахаридом  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$  с незакрепленной конфигурацией аномерного центра и совсем не ингибировалось гликозидом  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta\text{OBn}$ , а также монозидом  $\text{GalNAc}\alpha\text{OBn}$  [31, 34].

Особый интерес представляет факт связывания некоторых клеток лейкоцитарного ряда с зондами, несущими группоспецифические олигосахариды крови, трисахаридные остатки А и В. Функция самих антигенов  $\text{GalNAc}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$  (группоспецифический антиген А) и  $\text{Gal}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta$  (группоспецифический антиген В), несмотря на их широкую распространенность, остается неизвестной; не исключено, что обнаружение их специфических клеточных рецепторов – эндогенных лектинов – поможет ответить на этот вопрос. Интересно, что зонды со специфичностью А и Н (тип 1) значительно активнее связывались с некоторыми опухолевыми, и особенно метастазирующими, клетками [31–41]. Эти данные наводят на

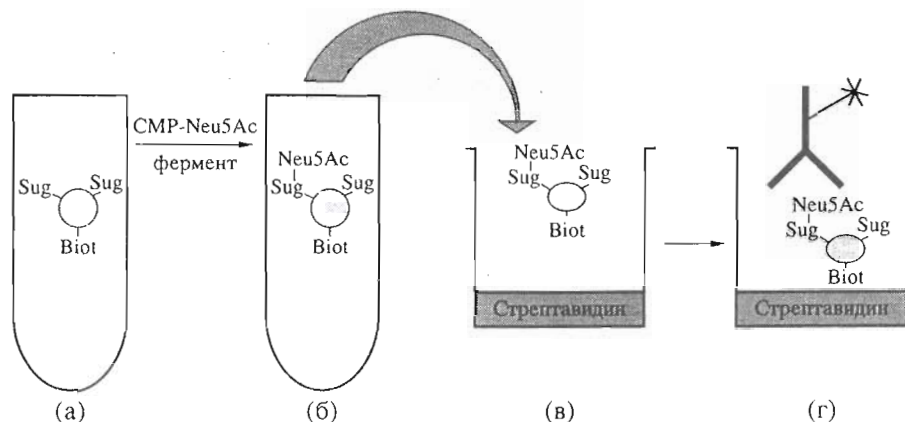
предположение, что А- и Н-специфичные лектины используются раковыми клетками в качестве адгезинов, взаимодействующих с гистоантигенами А и Н при метастазировании.

В экспериментах с зондом  $\text{SiaLe}^a$ -PHAA-Biot показано, что только карциномные (но не лейкемические) клетки специфически связывают опухолеассоциированный тетрасахарид  $\text{SiaLe}^a$  [36]. Интересно, что именно для карциномных клеток характерно накопление самого тетрасахарида  $\text{SiaLe}^a$ , в то время как лейкемические клетки накапливают тетрасахарид  $\text{SiaLe}^x$  [52]. Эти результаты и данные, полученные с помощью других зондов [53], а также некоторые литературные данные [47, 50] позволяют предположить, что накопление углеводных цепей вместе с накоплением специфичных к ним лектинов на поверхности тех же клеток – общее явление. По-видимому, увеличение концентрации на поверхности опухолевых клеток как углеводных опухолеассоциированных антигенов, так и комплементарных им лектинов – одна из причин отсутствия контактно-го ингибирования у опухолевых клеток [54].

Проточная цитофлуориметрия с использованием флуоресцентного зонда открывает дополнительные возможности в изучении эндогенных лектинов поверхности клеток, позволяя, в частности, работать с живыми клетками, узкими популяциями родственных клеток, оценивать связывание с лектинами и его ингибирование количественно, следить одновременно за несколькими маркерами (углеводными и неуглеводными) и т.д. Результаты взаимодействия клеточных популяций с зондом  $\text{SiaLe}^x$ -PHAA-Flu (рис. 10) позволяют заключить, что только моноциты (но не лимфоциты и гранулоциты) имеют рецептор тетрасахарида  $\text{SiaLe}^x$  и что связывание зонда с ним является дозозависимым [55].

Биотинилированные зонды применялись для обнаружения углеводсвязывающих белков в технике “дот-блот” при поиске новых лектинов в сыворотке крови человека. Сыворотку наносили на нитроцеллюлозу и затем обрабатывали широким набором биотинилированных зондов. С помощью данной методики было показано, что в сыворотке крови содержатся лектины, связывающиеся с  $6\text{PMan}\alpha$ ,  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$  и  $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta$  [56]. Впоследствии эти лектины были выделены и охарактеризованы [57].

Третий класс углеводсвязывающих белков, кроме лектинов и антител, которые можно изучать с помощью полиакриламидных конъюгатов, – гликозилтрансферазы (Л.С. Хральцова, Н.В. Бовин, неопубликованные результаты). Количественное определение этих ферментов необходимо не только при их изучении, но и для диагностики некоторых заболеваний, сопровождающихся изменением их концентрации [58]. Описанные ранее



**Рис. 11.** Схема количественного определения сиалилтрансферазы с помощью биотинилированного зонда. Sug-РНАА-Biot (а) инкубировался с CMP-Neu5Ac и исследуемым ферментом, продукт реакции (б) переносился на планшет с предварительно сорбированным стрептавидином; количество продукта реакции измерялось с помощью меченых антител или лектина (г).

подходы требуют специального оборудования и больших затрат времени, что неприемлемо для клинического анализа. В то же время схема анализа, основанная на использовании биотинилированных зондов в качестве акцепторов трансфераз, объединяет в себе высокую аналитическую чувствительность, точность и возможность одновременного проведения десятков анализов. Инкубация фермента с Sug-РНАА-Biot и радиоактивно меченым предшественником приводит к меченому продукту, который быстро и количественно сорбируется из раствора на стрептавидин, нанесенный на пластик; количество сорбированной радиоактивной метки пропорционально активности (концентрации) определяемого фермента. Более перспективным представляется вариант данного подхода без использования радиоактивной метки: гликозил-донор берется немеченый, а продукт ферментативной реакции, более сложный олигосахарид, количественно определяется с помощью моноклональных антител или лектина (рис. 11).

Зонды Sug-РНАА-Biot и Sug-РНАА-Flu использовались для изучения нового, недавно открытого [59, 60] типа биологического узнавания – углевод-углеводного. Углевод-углеводное взаимодействие кальцийзависимо, слабоаффинно и проявляется только в поливалентных системах – при взаимодействии клетки с клеткой, клетки с липосомой, липосомы с липосомой или липосомы с гликолипид-активированным пластиком, причем только при условии высокой плотности углеводных остатков [61]. Поэтому поливалентные зонды с гибкими, легко подстраивающимися лигандами могут стать удобным инструментом для обнаружения и моделирования углевод-углеводного узнавания. Так, с помощью Man-содержащих зондов показано наличие взаимодействия между полисахаридным комплексом дрожжей (зимозаном)

и маннозилированными гликоконъюгатами. Связывание было кальцийзависимым, углеводспецифичным (ингибировалось *D*-маннозой и *L*-фукозой, значительно слабее – другими моносахаридами) и зимозанспецифичным [60].

Неогликолипиды (второй лиганд – липофильный остаток) синтезировали, присоединяя к полимеру вслед за углеводным лигандом фосфатидилэтаноламин (PE). В некоторых случаях кроме PE вводили еще и метку – радиоактивную (см. ниже) или флуоресцентную. Последняя позволяла контролировать встраивание липофильных конъюгатов в клеточную мембрану с помощью проточной цитофлуориметрии. Обычно молярное соотношение исходных реагентов аминоклигликозид-PE-мономерное звено было 1 : 1 : 6; в тех случаях, когда нужно было повысить растворимость в неполярных органических растворителях и понизить растворимость в воде, оно составляло 1 : 2 : 10. Радиоактивно меченые производные (метка вводится либо в виде меченой аминокислоты, либо в виде “горячего” PE) использовали для количественной оценки встраивания неогликолипидов в биологические мембраны.

Варьируя молекулярную массу исходного РNРА, получали неогликолипиды с различными физико-химическими свойствами: 1) олигомерные производные ( $M < 10^4$  кДа), плохо растворимые в воде и хорошо – в органических растворителях, включая этанол и  $CHCl_3/MeOH$  (аналогично гликофинголипидам), 2) полимерные производные, растворимые в воде и водном метаноле. Различие в растворимости можно объяснить формированием в полимерных конъюгатах внутримолекулярного гидрофобного ядра и, напротив, отсутствием внутреннего структурирования в олигомерных (рис. 12а). Описанные здесь неогликолипиды напоминают осколки биологической мембраны

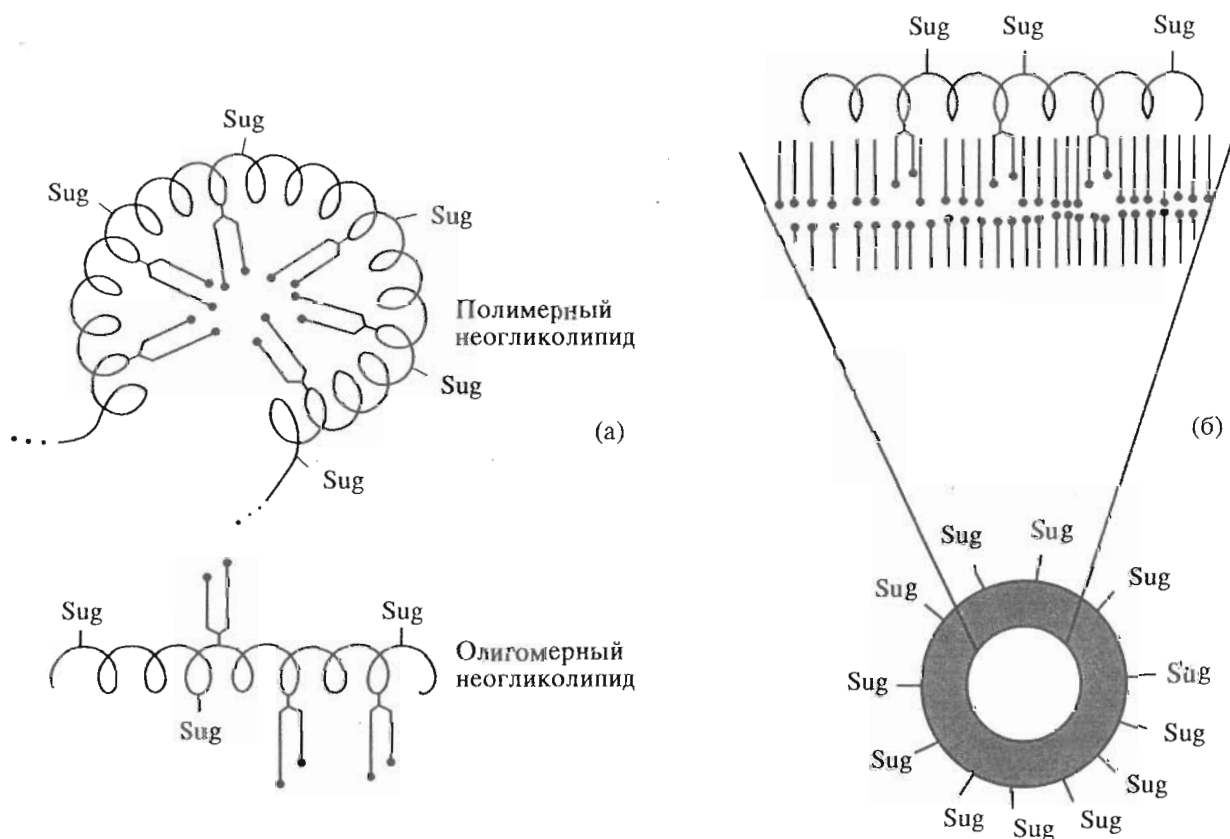


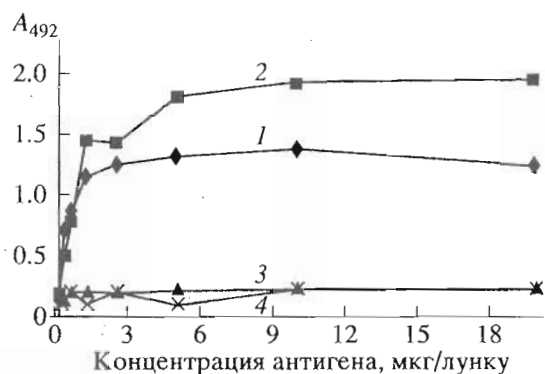
Рис. 12. Пространственная организация высоко- и низкомолекулярных неогликолипидов (а) и включение неогликолипида в клеточную мембрану (б). (а) – сверху: образование гидрофобного ядра (типа мицелл) полимерным конъюгатом; внизу: гибкая амфифильная структура олигомерного конъюгата. Sug – углеводные остатки, ● – остатки фосфатидилэтаноламина.

и, по-видимому, могут быть использованы для моделирования процессов шеддинга (сбрасывания фрагментов мембраны в окружающее пространство). Встраивание полимерных гликолипидов в мембрану клетки (рис. 12б) является мягким методом модификации ее поверхности дополнительным углеводным остатком; введенные углеводные цепи благодаря сближенности имитируют кластеры (patches) гликофинголипидов.

Если обычные (нелипофильные) гликополимеры полиакрилатного типа слабоиммуногенны [13], то неогликолипиды могут вызывать сильный иммунный ответ. Сорбированные на клетках *Salmonella minnesota* (мутантный штамм, содержащий низкое количество углеводов) неогликолипиды, несущие гаптены  $Le^y$ ,  $SiaLe^a$ ,  $SiaLe^x$ , использовались в качестве иммуногенов для получения моноклональных антител [5, 28, 62]. Адьювантные свойства бактерии обеспечивают иммунный ответ, а синтетический антиген – достаточное количество клонов, продуцирующих антитела необходимой специфичности. Рисунок 13 иллюстрирует абсолютную специфичность антител против тетрасахарида  $Le^y$  [26], которые не взаимодействуют со структурно близкими трисахаридами

$Le^x$  и  $H$  (тип 2). Таким образом, использование синтетического иммуногена дает возможность получать моноклональные антитела высокой специфичности.

Однако есть еще два уникальных преимущества данной методологии: 1) возможность получать антитела к скрытым (экранированным) и иммунологически “молчащим” (например, алло-) антигенам; 2) получение антител не только необходимой эпитопной, но и топографической специфичности; антитела могут узнавать один и тот же эпитоп (например, тетрасахарид, причем с белком непосредственно взаимодействуют все четыре моносахаридных остатка), но с разных направлений, например фронтально по отношению к мембранному антигену или “сбоку”. Очевидно, что фронтально узнающие антитела могут найти свой антиген, даже если последний расположен рядом с объемистым соседом или входит в состав гликолипидного “кэпа”, в то время как антитела, взаимодействующие под углом, должны испытывать пространственные затруднения. Это подтверждается следующим наблюдением: из девяти исследованных анти-А-моноклональных антител только три хорошо агглютинировали эритроциты



**Рис. 13.** Взаимодействие неогликоконъюгатов с моноклональными антителами, полученными против синтетического иммугена Le<sup>y</sup>: 1 – Le<sup>y</sup>-PНАА (10%); 2 – Le<sup>y</sup>-PНАА (30%); 3 – Le<sup>x</sup>-PНАА (30%); 4 – Н (тип 2)-PНАА (10%).

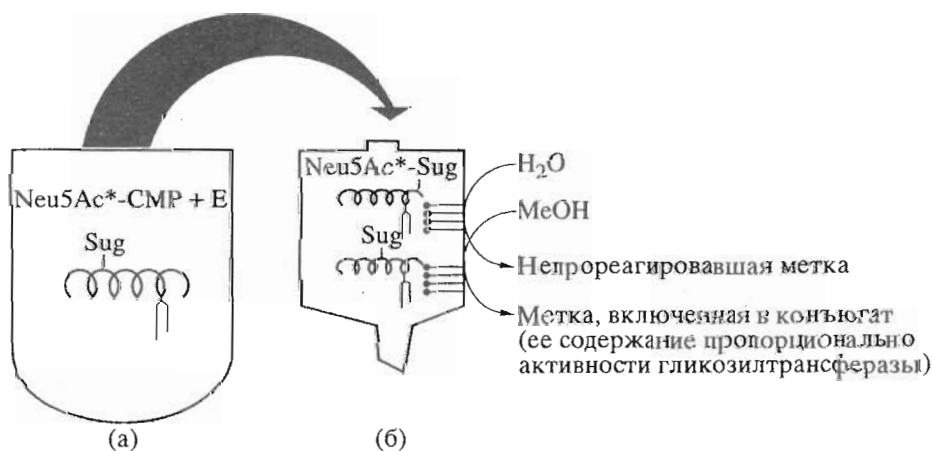
всех подгрупп А, именно эти три антитела значительно лучше остальных взаимодействовали и с максимально нагруженным (30 мол. %) синтетическим антигеном А-РНАА (Е.И. Дерюгина, неопубликованные результаты).

Таким образом, можно ожидать, что правильно сконструированный синтетический иммуноген может проводить преимущественную селекцию В-клеток, несущих антитела необходимой топологической специфичности. Действительно, иммуноген Le<sup>y</sup>-PНАА-РЕ с максимально возможной плотностью углеводного гаптена на полимерной цепи (при этом условии фронтальное взаимодействие становится предпочтительным) позволил получить антитела, хорошо узнающие тетрасахарид на поверхности Le<sup>y</sup>-положительных клеток [26]. По-видимому, используя более замысловатые конструкции иммуногенов, можно направленно

получать антитела с принципиально иной топографической специфичностью, например узнающие одновременно два или три (кластер) близко расположенных гаптена.

Еще одно применение полимерных липофильных конъюгатов – измерение активности гликозилтрансфераз – иллюстрируется рис. 14 (другие подходы см. в предыдущем разделе). Липофильный гликозил-акцептор под действием гликозилтрансферазы присоединяет радиоактивно меченый гликозил-донор; реакцию проводят в пробирке или иммунологическом планшете; Neu5Ac\* и продукты распада смывают водой, липофильные соединения (включающие меченый продукт гликозилирования) смывают метанолом.

**Гликочастицы (сорбенты и латексы, второй лиганд – нерастворимая частица) и гликоповерхности.** С помощью РNРА можно активировать, а затем модифицировать углеводом любую поверхность, декорированную первичными аминогруппами. Наибольшее распространение данный подход получил для синтеза аффинных сорбентов [63], в том числе и гликосорбентов [5, 21, 64–67], на основе аминпропилированного макропористого стекла с диаметром пор 2000 Å (рис. 15). Синтез проводили следующим образом [5]: аминпропилированную матрицу обрабатывали раствором РNРА, тем самым получая активированный носитель; затем уже к иммобилизованному полимеру присоединяли аминоклилкигликозид в количестве 0.5–20 мкмоль/г, после чего избыточные активные группы превращали в амидные действием этаноламина. Условия и количественная



**Рис. 14.** Измерение активности гликозилтрансферазы (E) с помощью полимерного неогликолипида (показан фрагмент). (а) – фермент переносит радиоактивно меченый моносахарид Neu5Ac\* на конъюгат, реакцию проводят в пробирке или иммунологическом планшете; (б) – реакционная смесь переносится на картридж с гидрофобным сорбентом; Neu5Ac\* и продукты распада смывают водой, липофильные соединения (включающие меченый продукт гликозилирования) смывают метанолом.

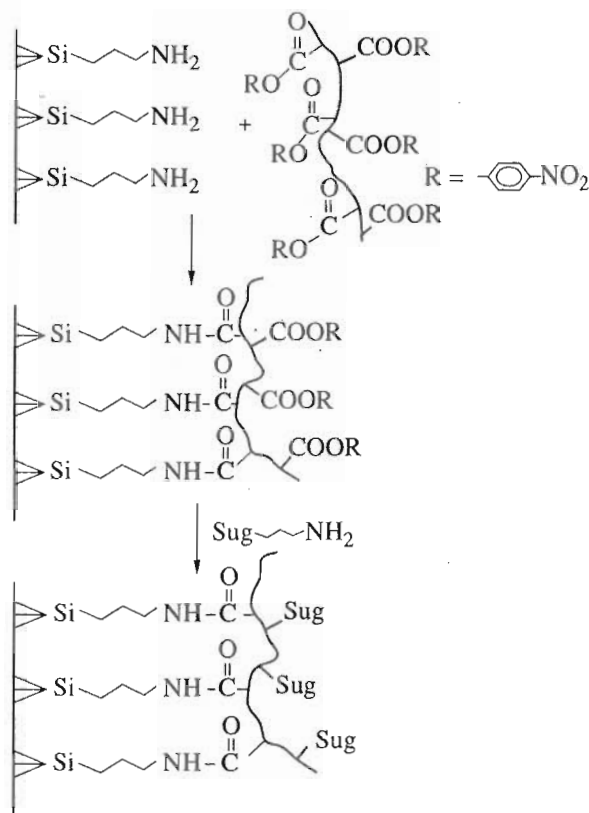


Рис. 15. Получение аффинного сорбента на основе макропористого стекла и РНАА.

сторона присоединения аминлигандов такие же, что и в случае синтеза зондов. Такие сорбенты кроме простоты их синтеза отличаются сочетанием механической прочности и гидрофилизированности поверхности, они удобны для аффинного выделения лектинов и антител [29, 68]. Благодаря полимерной связке между носителем и лигандом данные сорбенты приобретают выгодное для аффинной очистки свойство: белки могут быть элюированы с них в более мягких условиях, чем с традиционных сорбентов.

В качестве метки можно рассматривать и окрашенную латексную частицу, которая позволяет следить визуально за судьбой зонда. Латексные зонды сконструированы по принципу, аналогичному описанному выше, однако есть и отличия: полистирол-полиакролеиновые микрочастицы сначала покрывают альбумином (что необходимо для предотвращения самопроизвольной флокуляции) и уже к аминок группам альбумина присоединяют РНАА, причем углеводный лиганд в необходимом (оптимизированном) количестве присоединен к полимеру предварительно; финальная обработка аммиаком удаляет оставшиеся нитрофенильные группы. Метка-латекс (обычно ярко окрашенный) позволяет без прибора проводить полуколичественную оценку уровня антител (рис. 16) при опре-

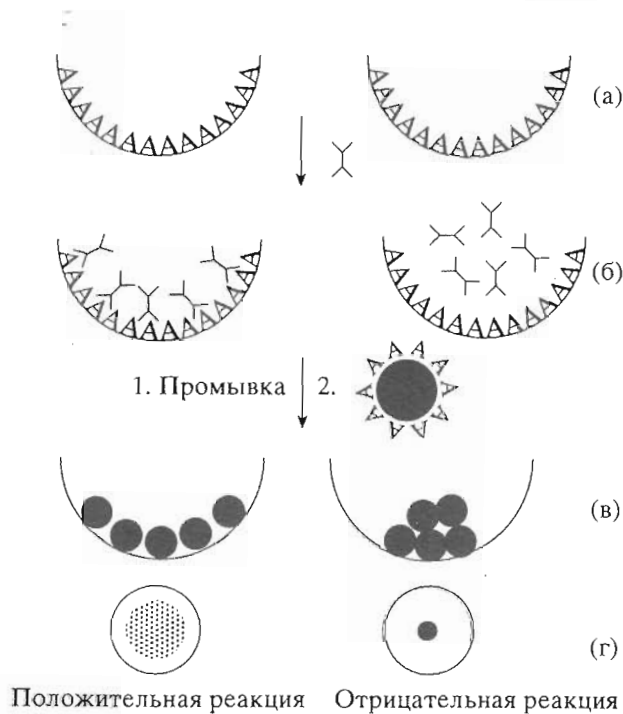
делении титра антител IgM и IgD против групповых антигенов крови анти-А и анти-В [69] и при диагностике лепры [70].

**Псевдогликопротеины.** Некоторые гликопротеины, такие, как уромодулин и  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин, модулируют иммунный ответ, воздействуя на клетки иммунной системы [71]. По-видимому, взаимодействие углеводных цепей гликопротеинов с углеводсвязывающими рецепторами клеток может носить кооперативный характер с участием нескольких идентичных или разных цепей. Удобными моделями для изучения кооперативности в процессе иммуномодуляции являются полусинтетические молекулы, которые можно назвать псевдогликопротеинами. Их получали [71], присоединяя к РНАА пул углеводных цепей изучаемого природного гликопротеина. Углеводные цепи предварительно тотально отщепляли от белковой цепи, превращали в гликозиламины и далее через аминок группы присоединяли к РНАА. Количественный выход на стадии конденсации позволял, во-первых, получать конъюгаты с тем же содержанием углеводов, что и в природном прототипе, а во-вторых, сохранять соотношение его углеводных цепей (рис. 17). Таким образом, конъюгат полностью имитирует только углеводную "шубу" гликопротеина, выводя из игры пептидный кор.

Такой подход позволил показать, что в  $\alpha_1$ -кислом гликопротеине за иммуномодулирующую активность ответственны углеводные N-цепи и что взаимное расположение цепей не принципиально для проявления биологического эффекта – псевдогликопротеин не только сохранял активность природной молекулы, но и был заметно более сильным ингибитором пролиферации лимфоцитов.

Последний рассмотренный пример примечателен еще тем, что методика присоединения нативных сиалированных N-цепей ничем не отличалась от стандартной, разработанной для нейтральных сахаридов. Индивидуальные сиалилолигосахариды также без каких-либо осложнений конденсировали с РНАА; синтетические олигосахариды, такие, как рецепторы селектинов SiaLe<sup>x</sup> и SiaLe<sup>a</sup>, присоединяли через спейсер O-гликозидного типа [72], олигосахариды молока и N-цепи превращали либо в аминокальдитолы, либо в гликозиламины, либо в гликозиламиды типа OS-NHCOCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>. Все четыре типа аминокпроизводных позволяют присоединять сиалилолигосахариды к полимеру количественно.

**Псевдомуцины.** Муцины представляют собой один из наиболее интересных классов гликопротеинов. Для них характерны высокая молекулярная масса (до нескольких миллионов дальтон), высокая степень гликозилирования (до 90 вес. % углеводов, преимущественно по остаткам Ser и Thr), высокое содержание остатков Pro, наличие

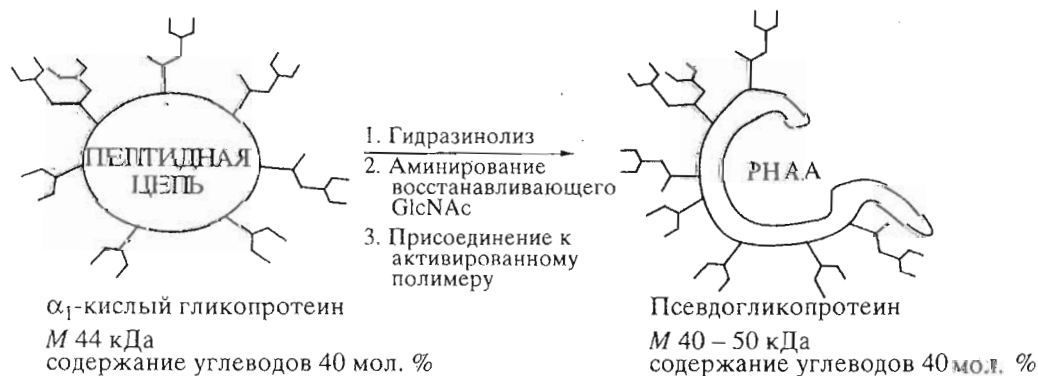


**Рис. 16.** Определение титра антител против группоспецифического А-антигена крови с помощью латекс-агглютинации в круглодонных 96-луночных планшетах: (а) – псевдополисахарид РНАА-А наносится на пластик; (б) – анти-А-антитела связываются с модифицированной поверхностью (слева), неспецифические антитела остаются в растворе (справа); (в) – после промывки в лунки добавляется латекс, несущий на поверхности иммобилизованный антиген А. Латекс, специфически связавшийся с антителами, равномерно покрывает поверхность лунки (слева); несвязавшийся латекс “стекает” на дно лунки; (г) – видимый результат положительной и отрицательной реакции. А – трисахарид А; Y – антитела, • – модифицированные латексные частицы [69].

отрицательно заряженных групп (Neu5Ac и O-сульфаты), чередование сильногликозилированных и “голых” участков полипептидной цепи и (довольно часто) субъединичная структура за счет множества S-S-связей [73]. Благодаря пере-

численным структурным особенностям муцины имеют раскрытую нитевидную форму, и поэтому в низких физиологических концентрациях их растворы имеют высокую вязкость. Вязкость и гетерогенное гликозилирование придают муцинам великолепные защитные свойства от микроорганизмов – вязкость как неспецифический компонент, а углеводные цепи, имитирующие клеточные рецепторы бактерий и вирусов, – как специфический. Кроме того, некоторые муцины играют важнейшую роль как специфические молекулы межклеточной адгезии [42]. Все это делает муцины привлекательным объектом для моделирования – синтеза псевдомуцинов, обладающих повышенными по сравнению с обычными гликопротеинами защитными и адгезионными (или антиадгезионными) свойствами.

Синтетический подход, основанный на использовании PNPA, позволяет получать не только средне- ( $M_r$  40 кДа), но и высокомолекулярные конъюгаты (Е.Ю. Корчагина, Н.В. Бовин, неопубликованные результаты). Схема синтеза последних изображена на рис. 18. К активированному полимеру присоединяли олигосахарид (последний может быть сиаилирован или сульфатирован, как во многих муцинах), после чего конденсировали со второй макромолекулой, несущей контролируемое число аминогрупп. Так как в воде растворим только второй полимер, а реакция проводится межфазно, тотальной сшивки с образованием преципитата не происходит, и в результате ограниченной сшивки образуется растворимый конъюгат “второго порядка” с массой несколько тысяч килодальтон. В полученном псевдомуцине гликозилированный полимер имитирует Ser/Thr-Sug-участки муцина, а негликозилированный – “голые”, Pro-богатые участки. Также высокомолекулярные, но еще растворимые конъюгаты с N-ацетилнейраминовой кислотой в качестве специфического лиганда показали заметно большую вируснейтрализующую активность по сравнению с конъюгатами массы 30–100 кДа [74].



**Рис. 17.** Перенос N-связанных углеводных цепей  $\alpha_1$ -кислого гликопротеина на полиакриламид [70].

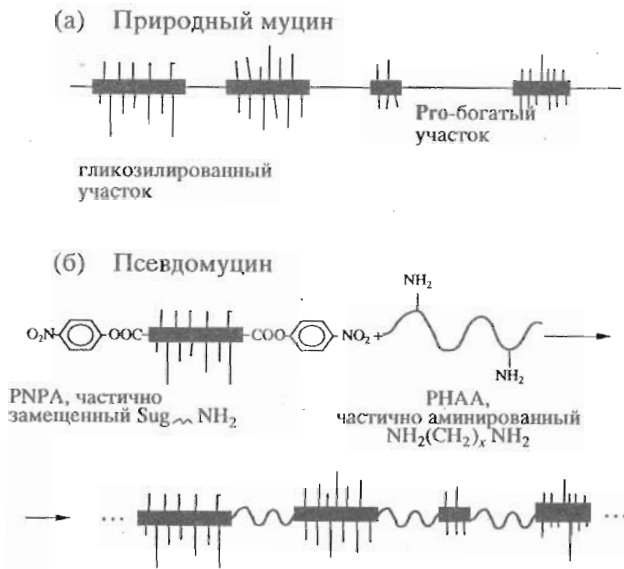


Рис. 18. Схематическое изображение природного муцина (а) и псевдомуцина, получаемого из гликополимера и второго, негликозилированного полимера, содержащего ограниченное количество аминогрупп (б).

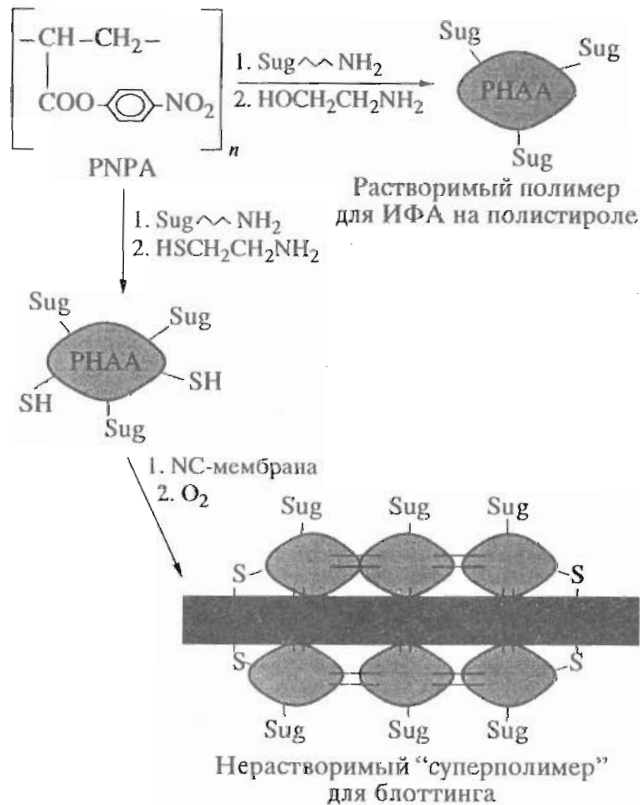


Рис. 19. Синтез двух типов гликозилированных полимеров для твердофазного анализа.

Для получения муциноподобных молекул применялся еще один подход, "биомиметический", а именно: в полимер с помощью  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$  вводилось ограниченное количество групп  $-\text{SH}$ , после

чего проводилось мягкое окисление (А.Б. Тузиков и Н.В. Бовин, неопубликованные данные). При этом, как и ожидалось, за счет образования межмолекулярных связей  $\text{S}-\text{S}$  накапливался высокомолекулярный продукт, однако в основном нерастворимый, т.е. контролировать окисление было практически невозможно. Тем не менее этот подход оказался полезен для иной цели – модификации нитроцеллюлозного носителя (рис. 19).

Как уже обсуждалось, обычные псевдополисахариды – удачные реагенты для анализа лектинов и антител на нитроцеллюлозе, в том числе при блоттинге. Однако замена их на  $\text{SH}$ -содержащие аналоги приводила к значительно лучшим результатам – после нанесения на нитроцеллюлозу и окисления кислородом воздуха конъюгаты давали поперечно-сшитый "суперконъюгат", нерастворимый и поэтому не смываемый с носителя в процессе анализа. Благодаря этому, например, чувствительность блот-анализа антигруппоспецифических антител А и В удалось поднять до уровня, достигаемого ранее только с помощью природных муцинов (R. Rieben, неопубликованные данные).

Как уже упоминалось, особенностью муцинов, связанной с их антимикробной активностью, является гетерогенность по углеводным цепям. В то же время известно несколько примеров, когда микроорганизм (например, *M. pneumoniae*, *H. pylori*) имеет два разных углеводсвязывающих рецепторных участка. Вводя в молекулу псевдомуцина оба активных сахара, можно значительно усилить антимикробное действие синтетического аналога. Следует отметить, что способ синтеза позволяет надеяться на введение двух лигандов как равномерно распределенных по макромолекуле, так и блоками (один лиганд на первичном полимере, а второй на сшивающем), что может иметь принципиальное значение для увеличения активности конъюгата при нейтрализации двухрецепторных микроорганизмов.

## ВЫВОДЫ

Суммируя, можно сформулировать следующие преимущества описанного способа синтеза конъюгатов полиакриламидного типа и их применения.

Реакция конденсации протекает количественно, что дает возможность без потерь использовать труднодоступные олигосахариды, а также синтезировать конъюгаты практически с любым заранее заданным составом; соотношение присоединенных лигандов равно исходному, введенному в реакцию.

Кроме углеводных в конденсацию можно вводить другие лиганды, тем самым получая зонды с различными метками, иммуногенами и гликочасти-



цы. Метод позволяет получать также псевдогликопротеины, псевдомуцины и другие сложные конструкции.

Можно направленно регулировать молекулярную массу, заряд, гидрофобность, растворимость и другие свойства конъюгатов.

Синтез предельно прост с методической точки зрения, проводится в рутинных условиях, не требующих низких температур и безводных растворителей; следить за ходом реакции можно с помощью ТСХ.

Простота методики и количественные выходы позволяют синтезировать микроколичества конъюгатов (0.1 мг).

Конъюгаты химически и термически устойчивы.

Благодаря инертной полиакрилатной матрице конъюгаты показывают низкую неспецифическую сорбцию по отношению к белкам и клеткам; сама по себе матрица не проявляет иммуногенных свойств.

Полиакриламид, будучи гибким полимером, служит дополнительным спейсером, благодаря чему во всех изученных случаях для взаимодействия сахара с белком достаточно было трехуглеродного спейсера. Гибкий полимерный клубок, по-видимому, обеспечивает оптимальное подстраивание сахара к белку в процессах кооперативного взаимодействия.

Серии конъюгатов с плавно меняющимся содержанием углеводного лиганда позволяют оценивать чувствительность взаимодействия к эпиплотности углеводного лиганда, а также подбирать конъюгаты, оптимальные для связывания в данной тест-системе.

## ПЕРСПЕКТИВЫ

Представленный материал показывает возможности применения полиакрилатного типа гликоконъюгатов для изучения, выделения и генерирования углеводсвязывающих белков. Очевидно, однако, что подход, основанный на взаимодействии РНРА с аминоклигандами, значительно шире, поскольку позволяет синтезировать конъюгаты практически любых низкомолекулярных соединений, если в их составе уже имеется (например, пептиды) или специально введена аминоклигандная группа. Так, конъюгат  $2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$  с РНАА в паре с антителами к нему лег в основу конкурентной тест-системы для выявления пестицида [75]. Проблем не возникает даже с гидрофобными лигандами, так как конечный конъюгат можно сделать более гидрофильным (и тем самым растворимым в воде), заменяя этаноламин на последней стадии синтеза, например, глюкозамином.

Наряду с продемонстрированными аналитическими возможностями полиакрилатных гликоконъюгатов нельзя не упомянуть и о некоторых потенциальных терапевтических применениях. Одно из них – нейтрализация вирусов гриппа в профилактических целях во время эпидемий. Как было показано выше (рис. 5), конъюгаты Neu5Ac с полиакриловой кислотой в низких концентрациях ингибируют связывание вирусов с клетками-мишенями. Электронно-микроскопические исследования (В.Д. Лотте, неопубликованные результаты) показали (рис. 20), что псевдополисахарид не только связывается с вирионом, но и коверкает главный его поверхностный белок, гемагглютинин, т.е. не только является виростатиком, но и имеет также вируцидные свойства.

Второй перспективной областью применения псевдополисахаридов и псевдомуцинов может стать нейтрализация желудочно-кишечных инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными бактериями, имеющими на поверхности лектины. К таким бактериям относятся некоторые штаммы *E. coli*, *Helicobacter pylori* и многие другие. Вариант применения из той же области – нейтрализация бактериальных токсинов, имеющих лектиновые субъединицы, например холеротоксина и ботулинотоксина.

Существуют проекты создания искусственного детского питания нового поколения [76], в состав которого будет вводиться сиалиллактоза, играющая в натуральном молоке роль нейтрализатора тех же бактерий и вирусов; в связи с этим представляется перспективным заменить сиалиллактозу на более эффективные гликоконъюгаты.

Недавно показана принципиальная роль сложных олигосахаридов (в данном случае  $\text{Le}^b$ ) в процессе фертилизации [46], что открывает возможность принципиально новых подходов к контрацепции и, наоборот, к лечению бесплодия с помощью гликоконъюгатов. Конъюгаты опухлеассоциированных олигосахаридов, таких, как Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ , с белком из улитки (KLH) используются в качестве противораковых вакцин [77]; гликоконъюгаты на основе полилизина ингибируют метастазирование [78]. Во всех этих случаях потенциального или уже начатого терапевтического применения гликоконъюгатов, особенно когда препарат предназначен для перорального использования, полиакрилатные матрицы представляются весьма перспективными в качестве носителя биологически активного углеводного лиганда в силу их инертности и стабильности, а также описанных выше возможностей по приданию конъюгату практически любых необходимых свойств; полиакрилаты уже прошли ряд испытаний в данном качестве [79, 80]. Недавнее открытие молекул клеточной адгезии – селектинон [42] и тетрасахаридов SiaLe $^x$  и SiaLe $^a$  в качестве их

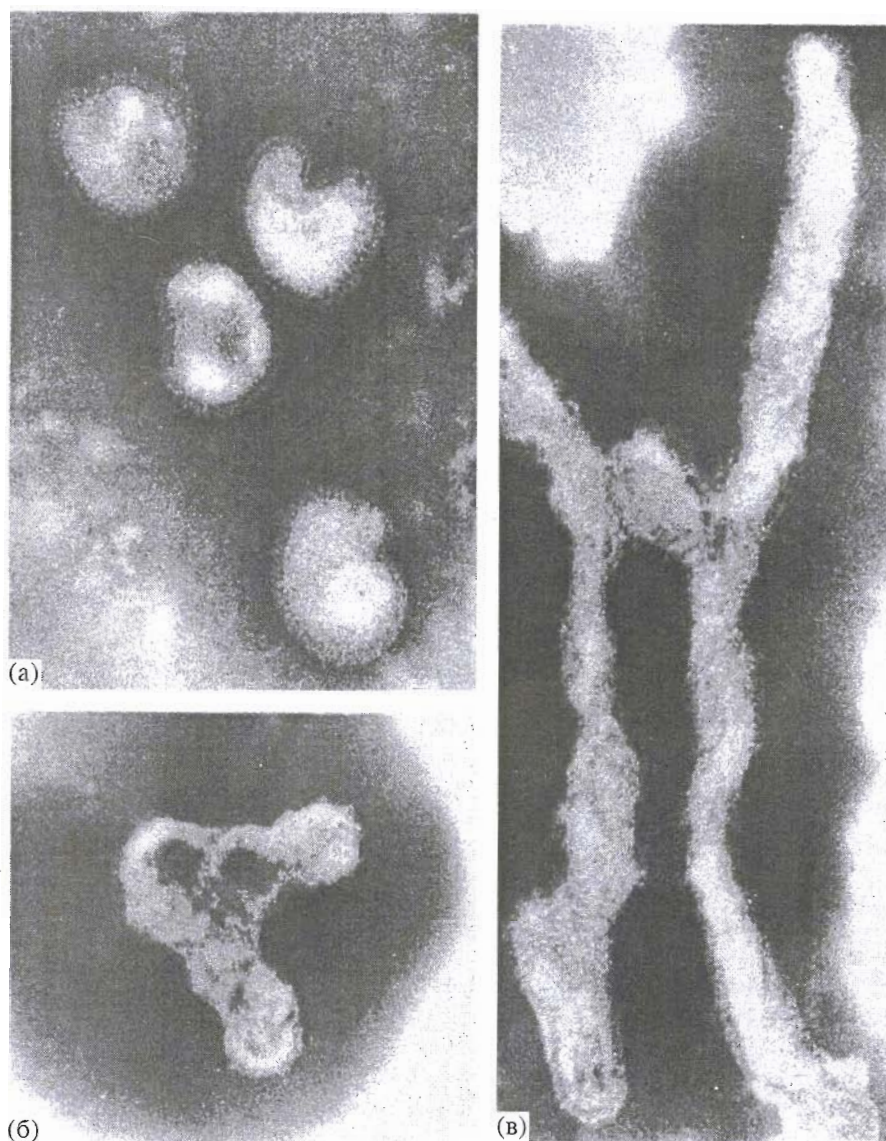
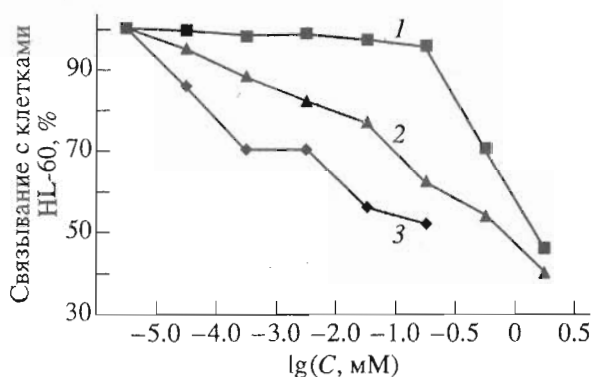


Рис. 20. Электронная микроскопия вируса гриппа. (а) – нативные вирусные частицы; (б, в) – вирусные частицы, обработанные конъюгатом Neu5Ac-PA.

лигандов открывает новые, совершенно уникальные возможности в лечении и коррекции ряда соматических заболеваний, в частности ишемии, воспалительных процессов, псориаза и многих других. Как показывают эксперименты *in vitro* (рис. 21), полиакриламидные конъюгаты данных тетрасахаридов на два порядка активнее мономеров в качестве ингибиторов селектинопосредованной адгезии клеток [30].

Еще одна перспективная область применения поливалентных гликоконъюгатов и гликосорбентов – это трансплантология. Пересадка человеческой почки или печени требует точнейшего подбора пары донор/реципиент по антигенам гистосовместимости, однако часто наблюдаются ситуации, когда идеальные по данному критерию

пары оказываются несовместимыми по группам крови, в частности по системе АВО: в крови реципиента могут находиться антитела против углеводных антигенов тканей почки донора. Разрешить эту ситуацию можно либо сорбцией мешающих антител на соответствующем гликосорбенте, либо их нейтрализацией с помощью вводимого в кровь углевода [81]. Аналогичная ситуация складывается с ксенотрансплантацией (свинья–человек) сердца, так как у любого человека в крови в высокой концентрации обнаруживаются цитотоксические анти-Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ -антитела, вызывающие быстрое отторжение [81]. Создание поливалентной формы олигосахарида-нейтрализатора, действующей в низкой концентрации и медленно выводимой из кровотока, могло бы решить



**Рис. 21.** Полимерный кооперативный эффект: тетрасахарид SiaLe<sup>x</sup>, присоединенный к ПНАА, на два порядка более активен, чем сам тетрасахарид в качестве ингибитора селективнопосредованной адгезии клеток линии HL-60 с эндотелиальными клетками. 1 – SiaLe<sup>x</sup>, 2 – SiaLe<sup>a</sup>, 3 – SiaLe<sup>a</sup>-ПНАА 20 мол. % [30].

проблемы как алло-, так и ксенотрансплантации, однако внутривенное применение потенциально-препарата накладывает особенно жесткие ограничения на матрицу-носитель. Обладают ли поли- (или, скорее, олиго-) акриламиды всем комплексом свойств, необходимых для внутривенного введения, предстоит выяснить.

На вопрос, будут ли реализованы перечисленные выше подходы, пока однозначно ответить невозможно, так как терапевтическое применение требует несомненно больше времени и осторожности, чем диагностическое. Однако с точки зрения технологии, гликотехнологии метод получения поливалентных производных биологически активных сахаридов путем конъюгации Sug-sp-NH<sub>2</sub> с активированным полимером представляется пригодным, так как отвечает самым главным требованиям – стандартности и воспроизводимости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee R.T., Lee Y.C. // Neoglycoconjugates: Preparation and Application / Eds Y.C. Lee, R.T. Lee. L.: Acad. Press, 1994.
2. Hanson J.E., Sauter N.K., Skehel J.J., Wiley D.C. // Virology. 1992. V. 189. P. 525–533.
3. Matrosovich M.N., Mochalova L.V., Marinina V.P., Byramova N.E., Bovin N.V. // FEBS Lett. 1990. V. 272. P. 209–211.
4. Byramova N.E., Mochalova L.V., Belyanchikov I.M., Matrosovich M.N., Bovin N.V. // J. Carbohydr. Chem. 1991. V. 10. P. 691–700.
5. Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., Byramova N.E., Galanina O.E., Zemlyakov A.E., Ivanov A.E., Zubov V.P., Mochalova L.V. // Glycoconj. J. 1993. V. 10. P. 142–151.

6. Gabius H.-J., Gabius S., Zemlyanukhina T.V., Bovin N.V., Brinck U., Danguy A., Joshi S.S., Kayser K., Schotelius J., Sinowatz F., Tietze L.F., Vidal-Vanaclocha F., Zanetta J.-P. // Histol. Histopath. 1993. V. 8. P. 369–383.
7. Bovin N.V. // Lectins and Glycobiology / Eds H.-J. Gabius, S. Gabius. B.: Springer-Verlag, 1993. P. 23–30.
8. Бовин Н.В., Зурабян С.Э., Хорлин А.Я. // Материалы XII Менделеевского съезда. Ч. 2. М.: Наука, 1981. С. 120–121.
9. Chernyak A.Ya., Antonov K.V., Kochetkov N.K., Padyukov L.N. // Carbohydr. Res. 1985. V. 141. P. 199–212.
10. Kallin E., Lonn H., Norberg T., Elofsson M. // J. Carbohydr. Chem. 1989. V. 8. P. 597–611.
11. Бовин Н.В., Иванова И.А., Хорлин А.Я. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. С. 662–670.
12. Хорлин А.Я., Бовин Н.В. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. С. 671–673.
13. Юровский В.В., Бовин Н.В., Сафронова Н.Г., Василев Р.Г., Хорлин А.Я. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 100–105.
14. Neoglycoconjugates: Preparation and Application / Eds Y.C. Lee, R.T. Lee. L.: Acad. Press, 1994.
15. Magnusson G., Chernyak A.Ya., Kihlberg J., Kononov L.O. // Neoglycoconjugates: Preparation and Applications / Eds Y.C. Lee, R.T. Lee. San Diego: Acad. Press, 1994. P. 53–143.
16. Magnusson G. // Adv. Drug Delivery Rev. 1994. V. 13. P. 267–284.
17. Stowell C.P., Lee Y.C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1980. V. 37. P. 225–281.
18. Su C.-P., Morawetz H. // J. Polymer Sci. 1977. V. 15. P. 185–196.
19. Ivanov A.E. // Macromolec. Reports, A31(Suppl. 5). 1994. P. 521–524.
20. Бовин Н.В. Неогликоконъюгаты: синтез и применение в гемо- и онкодиагностике. Дис. ... д-ра хим. наук. М.: И-т биоорганической химии РАН, 1993. С. 43.
21. Bovin N.V., Vlasova E.V., Galanina O.E., Khaidukov S.V., Tuzikov A.B., Tzvetkov Y.E., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E. // Leucocyte Typing V / Ed. S.A. Schlossman. Oxford: Oxford Univ. Press, 1995. P. 1534–1535.
22. Rieben R., Korchagina E.Y., von Allmen E., Kremer-Hovinga J., Lammle B., Jungi T.W., Bovin N.V., Nydegger U.E. // Transplantation. 1995. V. 60(5). P. 425–430.
23. Бовин Н.В., Шевелев Б.И., Брико Н.И., Дынга Л.О., Блинникова Е.И., Куксюк П.П., Мясоедова С.К., Амбросов И.В. // Клини. и лаб. диагностика. 1996. В печати.
24. Галанина О.Е., Дерюгина Е.И., Лапенков М.И., Носырев А.Е., Корчагина Е.Ю., Землянухина Т.В., Бовин Н.В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 343–352.
25. Галанина О.Е., Дерюгина Е.И., Оловникова Н.И., Носырев А.Е., Лапенков М.И., Чекнева Н.Б., Землянухина Т.В., Корчагина Е.Ю., Бовин Н.В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1177–1187.
26. Vlasova E.V., Byramova N.E., Tuzikov A.B., Zhigis L.S., Rapoport E.M., Khaidukov S.V., Bovin N.V. // Hybridoma. 1994. V. 13. P. 295–301.
27. Rye P.D., Bovin N.V., Vlasova E.V., Walker R.A. // Glycobiology. 1995. V. 5. P. 385–389.

28. Klein J., Kraus M., Ticha M., Zelezna B., Jonakova V., Kocourek J. // *Glycoconj. J.* 1995. V. 12. P. 51–54.
29. Галанина О.Е., Падманабхан С., Корчагина Е.Ю., Землянухина Т.В., Демин В.В., Бовин Н.В. // *Биоорганич. химия.* 1992. Т. 18. С. 346–356.
30. Weitz-Schmidt G., Stokmaier D., Scheel G., Nifant'ev N.E., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // *Analyt. Biochem.* 1996. In press.
31. Abramenko I.V., Gluzman D.F., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., Bovin N.V. // *FEBS Lett.* 1992. V. 307. P. 283–286.
32. Abramenko I.V., Gluzman D.F., Bovin N.V., Evsev'eva I. // *Histochem. J.* 1992. V. 24. P. 537–538.
33. Абраменко И.В., Бовин Н.В., Глузман Д.Ф. // *Цитология.* 1993. Т. 35. С. 91–95.
34. Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., Gluzman D.F., Abramenko I.A. // *Eksp. Onkol.* 1993. V. 15. P. 41–46.
35. Абраменко И.А., Глузман Д.Ф., Бовин Н.В. // *Эксперим. онкология.* 1993. Т. 15. С. 40–43.
36. Nifant'ev N.E., Shashkov A.S., Tsvetkov Y.E., Tuzikov A.B., Abramenko I.V., Gluzman D.F., Bovin N.V. // *ACS Symp. Ser. Volume "Synthetic Oligosaccharides: Indispensable Probes for the Life Sciences"* / Ed. P. Kovac. Washington DC: ACS, 1994. P. 267–275.
37. Kayser K., Bovin N.V., Korchagina E.Y., Zelinger C., Zeng F.-Y., Gabius H.-J. // *Eur. J. Cancer.* 1994. V. 30A. P. 653–657.
38. Kayser K., Bovin N.V., Zemlyanukhina T.V., Donald-Jacinto S., Koopmann J., Gabius H.-J. // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11. P. 339–344.
39. Kayser K., Bubbenzer J., Kayser G., Eichhorn S., Zemlyanukhina T.V., Bovin N.V., Andre S., Koopmann J., Gabius H.-J. // *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1995. V. 17. P. 135–142.
40. Gabius S., Kayser K., Bovin N.V., Yamazaki N., Kojima S., Kaltner H., Gabius H.-J. // *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* 1996. In press.
41. Kayser K., Bovin N.V., Wiegandt H., Andre S., Gabius S., Zeng F.-Y., Gabius H.-J. // *Arq. Pathol.* 1994. V. 26. P. 19–26.
42. Rosen S.D., Bertozzi C.R. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994. V. 6. P. 663–673.
43. Danguy A., Kayser K., Bovin N.V., Gabius H.-J. // *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 1995. V. 7. P. 261–275.
44. Gabius H.-J. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1988. V. 27. P. 1267–1276.
45. *Lectins and Glycoconjugates in Oncology* / Eds H.-J. Gabius, G.A. Nagel. B.: Springer-Verlag, 1988.
46. Lucas H., Bercegeay S., LePendou J., Jean M., Mirallie S., Barriere P. // *Hum. Reproduction.* 1994. V. 9. P. 1532–1538.
47. Gabius S., Kayser K., Hellman K.P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 169. P. 239–244.
48. Tiemeier M., Yasuda Y., Schnaar R.L. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 264. P. 1671–1681.
49. Solomon J.C., Stoll M.S., Penfold A., Abbott W.M., Childs R.A., Hanfland D., Feizi T. // *Carbohydr. Res.* 1991. V. 213. P. 293–307.
50. Tietze L.F., Schroter C., Gabius S., Brinck U., Goerlach-Graw A., Gabius H.-J. // *Bioconj. Chem.* 1991. V. 2. P. 148–153.
51. Bezouska K., Yuen C.-T., O'Brien J., Childs R.A., Chai W., Lawson A.M., Drbal K., Fiserova A., Pospisil M., Feizi T. // *Nature.* 1994. V. 372. P. 150–157.
52. Takada A., Ohimori K., Yoneda T., Tsuyuko K., Hasegawa A., Kiso M., Kannagi R. // *Cancer Res.* 1993. V. 53. P. 354–361.
53. Gabius H.-J., Schroter C., Gabius S., Brinck U., Tietze L.-F. // *J. Histochem. Cytochem.* 1990. V. 38. P. 1625–1631.
54. Zanetta J.-P., Badache A., Maschke S., Marschal P., Kuchler S. // *Histol. Histopath.* 1994. V. 9. P. 385–412.
55. Шиян С.Д., Хайдуков С.В., Пухальский А.Л., Тонтыгина А.П., Бовин Н.В. // *Гематол. трансфузиол.* 1996. Т. 2. С. 24–29.
56. Абраменко И.В., Глузман Д.Ф., Тьртъиш Т.В., Бовин Н.В. // *Эксперим. онкология.* 1996. Т. 18. С. 26–29.
57. Рапопорт Е.М., Жигис Л.С., Корчагина Е.Ю., Овчинникова Т.В., Зубов В.П., Бовин Н.В. // *Биоорганич. химия.* 1996. Т. 22. С. 353–357.
58. Gross H.J., Brossmer R. // *Clin. Chem. Acta.* 1991. V. 197. P. 237–248.
59. Михальчик Е.В., Коркина Л.Г., Шиян С.Д., Бовин Н.В. // *Биол. мембраны.* 1994. Т. 11. С. 581–587.
60. Bovin N.V., Shiyun S.D., Mikhilchik E.V. // *Glycoconj. J.* 1995. V. 12. P. 427.
61. Nakomori S. // *Biochem. Soc. Trans.* 1993. V. 21. P. 584–595.
62. Власова Е.В., Ворожайкина М.М., Хральцова Л.С., Тузиков А.Б., Попова И.С., Цветков Е.Ю., Нифантьев Н.Э., Бовин Н.В. // *Биоорганич. химия.* 1996. Т. 22. С. 269–276.
63. Ivanov A.E., Zubov V.P. // *J. Chromatogr.* 1994. V. 673. P. 159–165.
64. Rieben R., von Allmen E., Korchagina E.Y., Nydegger U.E., Neethling F.A., Kujundzic M., Koren E., Bovin N.V., Cooper D.K.C. // *Xenotransplantation.* 1995. V. 2. P. 98–106.
65. Бовин Н.В., Землянухина Т.В., Чагиаишвили Ц.Н., Хорлин А.Я. // *Химия природ. соединений.* 1988. Т. 6. С. 777–785.
66. Ivanov A.E., Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zubov V.P. // *Biomed. Chromatogr.* 1992. V. 6. P. 39–42.
67. Rieben R., von Allmen E., Nydegger U., Korchagina E.Y., Bovin N.V. // *Transfusion.* 1993. V. 33. Suppl. P. 24S.
68. Чагиаишвили Ц.Н., Зотиков Е.А., Бовин Н.В., Корчагина Е.Ю. // *Гематол. трансфузиол.* 1989. Т. 8. С. 56–58.
69. Корчагина Е.Ю., Лукин Е.Ю., Климова К.Н., Минева Н.В., Бовин Н.В., Зубов В.П., Волкова О.Я. // *Гематол. трансфузиол.* 1992. Т. 3. С. 34–35.

70. *Dyachina M.N., Lukin Yu.V., Zubov V.P., Bovin N.V.* // *Int. J. Leprosy.* 1992. V. 60. P. 575–579.
71. *Шиян С.Д., Пухальский А.Л., Топтыгина А.П., Насонов В.В., Бовин Н.В.* // *Биоорган. химия.* 1994. Т. 20. С. 994–1000.
72. *Нифантьев Н.Э., Цветков Ю.Е., Шашков А.С., Тузиков А.Б., Масленников И.В., Попова И.С., Бовин Н.В.* // *Биоорган. химия.* 1994. Т. 20. С. 552–555.
73. *Neura M.N., Forstner J.F.* // *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* 2nd ed. / Ed. L.R. Johnson. N.Y.: Raven Press, 1987. P. 975–1009.
74. *Mochalova L.V., Tuzikov A.B., Marinina V.P., Gambaryan A.S., Vyramova N.E., Bovin N.V., Matrosovich M.N.* // *Antiviral Res.* 1994. V. 23. P. 179–190.
75. *Lukin Yu.V., Pavlova I.S., Lyubavina I.A.* // 211th ACS National Meeting. Ser. V. 36. № 1 / Ed. M.J.M. Wells. Washington DC: ACS, 1996. P. 116–117.
76. *Hodgson J.* // *Biotechnology.* 1995. V. 13. P. 38–39.
77. *MacLean G.D., Reddish M., Kogamty R.R., Wong T., Gandhi S., Smolenskim M., Samuel J., Nabholz J.M., Longenecker B.M.* // *Cancer Immunol. Immunother.* 1993. V. 36. P. 215–222.
78. *Dean B., Oguchi H., Cai S., Otsuji E., Tashiro K., Nakomori S., Toyokuni T.* // *Carbohydr. Res.* 1993. V. 245. P. 175–192.
79. *Rihova B., Rathi R.C., Kopeckova P., Kopecek J.* // *Int. J. Pharmaceut.* 1992. V. 87. P. 105–116.
80. *Покровский В.И., Тендетник Ю.А., Овчарова Н.М., Кочетков Н.К., Дмитриев Б.А., Черняк А.Я.* // *Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол.* 1983. Т. 4. С. 62–65.
81. *Cooper D.K.C., Kehoe Y.Ye., Niekrasz M., Rolf L.L., Jr., Martin M., Baker J., Kosanke S., Zuhdi N., Worsley G., Romano E.* // *Transplant. Proc.* 1992. V. 24. P. 566–571.

## Polyacrylamide-Based Glycoconjugates as Tools for Studying Lectins, Antigens and Glycosyltransferases in Glycobiology, Cytochemistry, and Histochemistry

N. V. Bovin

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow GSP-7, 117871 Russia*

**Abstract**—The synthesis, physicochemical characteristics, and application for studying the carbohydrate-binding molecules of some analogues of human cell glycoconjugates, neoglycoconjugates, were reviewed. An approach to the synthesis of the polyacrylamide derivatives of carbohydrates based on the interaction of fully activated polyacrylic acid with  $\omega$ -aminoalkyl glycosides was described. It provides highly reproducible results, is more simple than the previously known methods of the synthesis of such derivatives, and expands the range of synthetic possibilities because it can provide both the sugar–polymer type molecules and conjugates bearing various labels and effectors, sorbents, glycosurfaces, etc. In the first part of the review, the synthesis of polyacrylamide conjugates and their physicochemical properties were described. In its second part, the synthesis of some complex constructions, such as pseudoglycoproteins, pseudomucins, glycoparticles, and glycosurfaces, was outlined. Some examples of the application of the described conjugates in various fields of glycobiology were simultaneously discussed. Prospects of the further development of the presented approach in glycotechnology and medicine were also described.

*Key words:* carbohydrates, glycoconjugates, polyacrylamide, lectins, antibodies, glycosyltransferases, immunoassay, cytochemistry, histochemistry.