



УДК 547.458.1:543.424

ИССЛЕДОВАНИЕ СИАЛИРОВАННЫХ НЕОГЛИКОКОНЪЮГАТОВ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

© 1997 г. А. В. Феофанов, В. А. Олейников[#], А. Б. Тузиков,
А. И. Януль, Е. Ю. Крюков, Н. В. Бовин, И. Р. Набиев

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

Поступила в редакцию 29.01.97 г. Принята к печати 30.06.97 г.

Методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) изучены неогликоконъюгаты на основе полиакриламида и полиакриловой кислоты, содержащие в качестве боковых групп N-ацетилнейраминную кислоту или сиалоолигосахариды. Ранее установлено, что эти полимеры способны эффективно ингибировать адгезию вируса гриппа. В данной работе показано, что по интенсивности сигнала ГКР можно оценивать общую доступность для взаимодействия и конформационную свободу остатков сиаловой кислоты в составе конъюгатов. Исследована зависимость этих двух факторов от структуры и плотности сиалированных боковых цепей. Показана однородность распределения сиалированных боковых цепей в конъюгатах. Сопоставление результатов спектроскопии ГКР конъюгатов с результатами ингибирования ими адгезии конкретных штаммов вируса гриппа позволило определить конъюгаты, для которых доступность и конформационная свобода сиаловой кислоты являются основными факторами, определяющими их ингибиторные свойства, а также сделать выводы о преобладании одного из механизмов (конкурентного ингибирования или стерической стабилизации) в ингибиторных свойствах конкретных конъюгатов.

Ключевые слова: сиаловые кислоты, сиалоолигосахариды, полимерные сиалозиды, неогликоконъюгаты, спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния, ГКР.

Мембраносвязанные гликоконъюгаты, терминальным элементом которых является остаток сиаловой кислоты (SA), играют важную роль в процессах межклеточного узнавания и клеточной адгезии вирусов [1]. Именно SA-содержащие группы, расположенные на периферии гликокаликса, являются лигандами для гемагглютинина (HA) – лектина вируса гриппа. Сиалированные N-гликаны, как правило, полиантенны, O-гликопротеины муцинового типа несут множество сиалированных цепей, мембранные ганглиозиды образуют кластеры – все это говорит о том, что на поверхности клетки сиалозиды почти всегда образуют мультивалентные структуры. Первичное взаимодействие вируса гриппа с клеткой происходит за счет кооперативного взаимодействия кластеров HA вируса с мультивалентными кластерами мембраносвязанных сиалогликоконъюгатов клетки.

В последние годы получены синтетические олигомерные, полимерные, а также липосомные сиалозиды, способные к кооперативному связыванию с HA вируса, которые характеризуются высокой эффективностью в ингибировании клеточной адгезии вируса [2–5]. Предполагается наличие двух механизмов, лежащих в основе ингибиторных свойств полимерных сиалогликоконъюгатов: классическое конкурентное ингибирование и так называемая стерическая стабилизация [6]. Стерическая стабилизация – это состояние, при котором ограниченное количество (десятки) крупных молекул полимера, связавшись с вирусом, стерически препятствуют взаимодействию свободных центров HA с клеткой, т.е. для эффективного ингибирования необходимо нейтрализовать лишь небольшую часть гемагглютининов на поверхности вириона.

Поиск оптимального дизайна полимерных сиалогликоконъюгатов – ингибиторов адгезии вируса – ведется путем варьирования природы, плотности и антенности гликанов на полимере, способа их присоединения к полимеру, структуры и длины сиаловой части углеводной цепи, а также введением дополнительных заместителей в

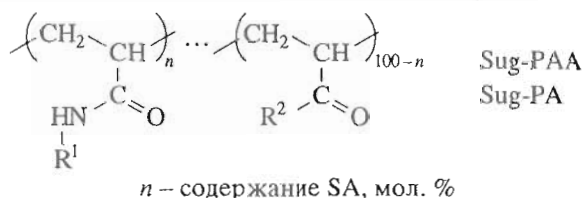
Сокращения: КР – комбинационное рассеяние; ГКР – гигантское КР; Sug – моно- или олигосахаридный остаток со спейсерной группой; PA – полиакриловая кислота; PAA – полиакриламид; SA – сиаловая кислота; HA – гемагглютинин вируса гриппа.

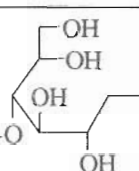
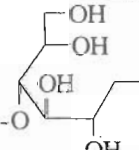
[#] Автор для переписки (e-mail: raman@siobc.ras.ru; тел./факс: (095)336-17-66).

боковые цепи полимера [2, 4, 7]. Показано, что ингибиторные свойства полимерного сиалогликоконъюгата меняются сложным образом не только в зависимости от его строения, но также от типа и подтипа вируса. Однако на основании только сравнения ингибиторной активности конъюгатов разной структуры трудно определить для каждого из них возможный механизм ингибирования [4, 7]. В то же время выявление факторов, способствующих эффективной реализации одного из механизмов, играющих специфическую роль в ингибировании тех или иных штаммов вируса и/или выступающих необходимым условием ингибирования для большинства штаммов вируса, очень важно для направленного конструирования новых более мощных ингибиторов.

В данной работе представлены результаты применения спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) для оценки условий, являющихся необходимыми во взаимодействии синтетических сиалогликоконъюгатов с НА вируса гриппа: общей доступности SA для взаимодействия и конформационной свободы SA в составе сиалогликоконъюгатов. Спектроскопия ГКР впервые использована для изучения архитектуры синтетических сиалогликоконъюгатов и является одним из немногих методов, применимых в данной области.

Методом ГКР проведено исследование неогликоконъюгатов на основе полиакриловой кислоты (Sug-PA) и полиакриламида (Sug-PAA), различающихся зарядом, а следовательно, конформацией и жесткостью главной полимерной цепи.



	R ¹	R ²
(Ia) (Iб)	Neu5Acα2-OCH ₂ C ₆ H ₄ NH(CO)CH ₂ -	HO- HO(CH ₂) ₂ NH-
(IIa)	Neu5Acα2-3Galβ1-O 	HO-
(IIIa)	Neu5Acα2-6Galβ1-O 	HO-

Помимо типа полимерного носителя варьировались структура асиаловой части боковых цепей и

содержание (плотность) SA на полимерном носителе. Для сопоставления с данными ГКР использованы опубликованные ранее [2–4, 7], а также не представленные в печати (А.С. Гамбарян, М.Н. Матросович, Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, неопубликованные результаты) материалы исследования ингибиторной активности этих полимеров.

Спектроскопия ГКР – уникальный метод, дающий возможность селективно регистрировать сигналы SA в составе гликозидов, сиалоолигосахаридов, гликопротеинов, неогликоконъюгатов и клеточных мембран при низкой (вплоть до 10⁻⁵ М) концентрации SA [8–11]. Селективность спектроскопии ГКР в отношении остатков SA, находящихся на периферии молекулярных или мембранных структур, базируется на общих для всех молекул особенностях метода: 1) при адсорбции молекул на подготовленной специальным образом серебряной поверхности происходит усиление сигнала их комбинационного рассеяния (КР) в миллион и более раз; 2) эффект усиления сигнала КР имеет место для молекул и их фрагментов, непосредственно адсорбированных или находящихся на расстоянии не более 10 Å от ГКР-активной поверхности [12]. Удаленные от поверхности и заглубленные внутрь молекулы группировки дают только фоновый, неусиленный сигнал КР.

Ранее показано, что при использовании в качестве ГКР-активной системы цитратного гидрозоль серебра адсорбция SA-содержащих молекул реализуется преимущественно через остатки SA, колебания которых избирательно усиливаются в спектре ГКР [8–10]. При исследовании различных сиалозидов установлено, что для адсорбции на ГКР-активной поверхности важны карбоксильная и N-ацетильная группы, а также гидроксильные глицирильного остатка SA [11], т.е. те же группы, что и для связывания с НА [13–18]. Наличие корреляции между интенсивностью спектров ГКР сиалозидов и их связыванием с НА вируса гриппа позволяет предположить, что при образовании комплексов с гемагглютинином и при адсорбции на ГКР-активной поверхности определяющим фактором является расположение остатков SA на полимере [11]. Этот вывод подтверждается также обнаруженной ранее корреляцией между интенсивностью спектра ГКР сиалогликоконъюгатов и их эффективностью в ингибировании адгезии вируса гриппа [9].

ГКР-СПЕКТРЫ СИАЛОГЛИКОКОНЬЮГАТОВ

Спектры ГКР сиалированных конъюгатов (рис. 1а, 1б) принципиально отличаются от спектров исходных полимерных носителей (рис. 1в, 1г).

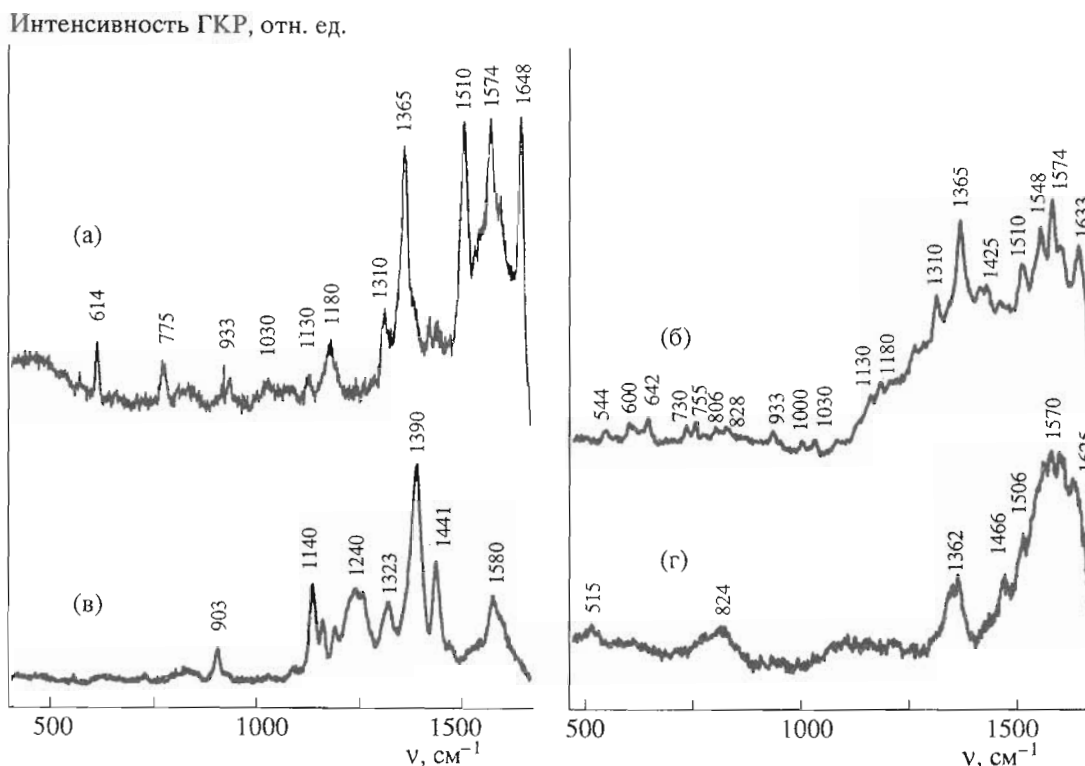


Рис. 1. Спектры ГКР неогликоконъюгатов (Ia) с содержанием сиаловой кислоты 10 мол. % (а), (Iб) с содержанием сиаловой кислоты 25 мол. % (б), несиалированных полимеров РА (в) и РАА (г). Концентрация конъюгатов по сиаловым кислотам 1 мМ, концентрация несиалированных полимеров 2.5 мг/мл ($M \sim 30$ кДа).

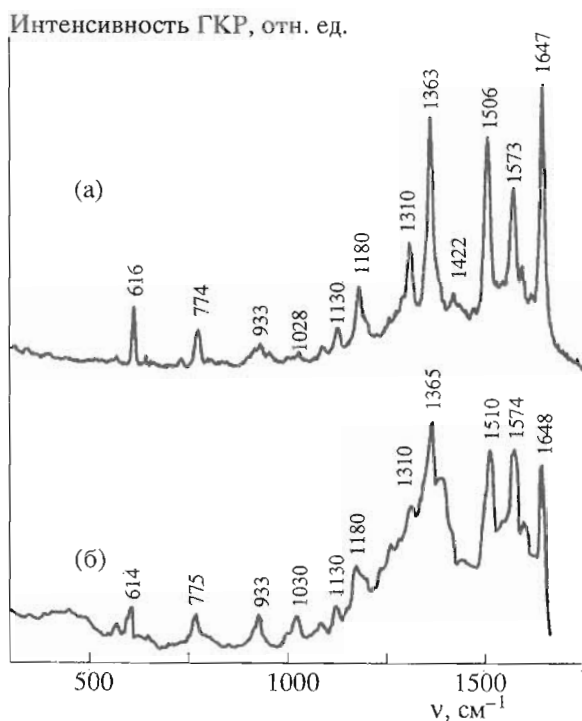


Рис. 2. Спектры ГКР α -метилгликозида N-ацетилнейраминной кислоты (а) и олигосахарида Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc (б). Концентрация 1 мМ.

Основной вклад в спектры ГКР сиалированных неогликоконъюгатов дают колебания остатков сиаловых кислот. Об этом свидетельствует сходство, а для ряда неогликоконъюгатов и идентичность их спектров ГКР (рис. 1а, 1б) с ГКР-спектрами моносиалозидов (рис. 2а и данные работы [11]) и олигосахаридов Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc (рис. 2б) и Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc – боковых цепей неогликоконъюгатов (IIа) и (IIIа).

Колебания основной цепи и боковых групп неогликоконъюгатов в спектрах ГКР не проявляются. Полное исчезновение линий ГКР полимера и замещение их спектров SA наблюдается уже при небольшой плотности сиалированных боковых цепей (5 мол. % и более), что указывает на изменение характера адсорбции конъюгатов на поверхности серебра. Таким образом, адсорбция сиалированных неогликоконъюгатов происходит через остатки SA, а контакт полимерного носителя с ГКР-активной поверхностью эффективно исключается. Для всех исследованных гликоконъюгатов с возрастанием плотности остатков сиаловой кислоты наблюдалось изменение общей интенсивности спектра ГКР, при этом относительная интенсивность и положение спектральных линий не изменялись.

Интерпретация колебаний в спектрах ГКР сиалированных неогликоконъюгатов на полимерных носителях

Неогликоконъюгаты				α -Метилгликозид N-ацетилнейраминовой кислоты [11]	Соотнесение
(Ia)	(Iб)	(IIa)	(IIIa)		
1648vs		1648vs	1648s	1647vs	<i>ц</i> -Амид I
	1633s		1622vw	1625w	<i>т</i> -Амид I
1596sh	1596sh	1596w	1596sh	1596w	$\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$
1574vs	1574vs	1574vs	1574vs	1573s	<i>т</i> -Амид II
1543sh	1548m	1543vw	1543sh		$\delta(\text{CON})$, $\delta(\text{CCH})$
1510s	1510m	1510vs	1510s	1506vs	<i>ц</i> -Амид II
1425vw	1425w	1425vw	1425vw	1422w	$\delta(\text{CON})$, $\delta(\text{CCH})$, $\delta(\text{OCH})$
1365vs	1365vs	1365vs	1365vs	1363vs	$\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$
1310m	1310m	1310m	1310m	1310m	<i>т</i> -Амид III
1180m	1180vw	1180m	1180m	1180m	$\delta(\text{OCH})$, $\delta(\text{CCH})$
1130w	1130vw	1128w	1128w	1130m	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{OC})$
1030w	1020w	1030w	1030w	1028w	$\nu(\text{OC})$, $\nu(\text{CC})$
	1000w				$\delta(\text{CCO})$, $\delta(\text{CCH})$, $\delta(\text{OCH})$
933w	933w	933m	933m	933w	$\nu(\text{ClO}_4^-)$
	828vw				$\delta(\text{CCO})$, $\delta(\text{CCH})$, $\delta(\text{OCH})$
775m	806vw	775m	775m	774m	$\delta(\text{CCO})$, $\delta(\text{CCH})$, $\delta(\text{OCH})$
614m		614m	614m	616m	$\delta(\text{COO}^-)$

Примечание. Интенсивности линий ГКР: vw – очень слабая, w – слабая, m – средняя, s – сильная, vs – очень сильная, sh – плечо, *ц* и *т* – *цис*- и *транс*-конформации ацетамидной группы.

Сходство ГКР-спектров остатков сиаловых кислот в составе моносиалозидов и гликоконъюгатов указывает на сходную геометрию их адсорбции и позволяет положить в основу интерпретации спектров неогликоконъюгатов (таблица) результаты отнесения линий ГКР-спектров моносиалозидов [11]. Используя ранее предложенную модель адсорбции моносиалозидов [11], можно сделать вывод, что адсорбция SA в составе полимера происходит через карбоксильную группу за счет электростатических взаимодействий и/или водородного связывания обоих атомов кислорода с центрами адсорбции. При этом плоскость, в которой лежит карбоксильная группа, ориентирована по нормали (или под небольшим углом к нормали) к серебряной поверхности. Гидроксильные группы глицерильного фрагмента C7–C9 принимают участие в адсорбции, определяя как ее эффективность, так и специфическую ориентацию остатка SA, при которой ацетамидная группа оказывается сближенной с поверхностью, и OCNH-фрагмент фиксируется либо в *транс*-, либо в *цис*-конформации.

Как и в случае моносиалозидов, в спектрах сиалированных гликоконъюгатов наиболее интенсивны линии колебаний карбоксильной группы ($\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$, $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$ и $\delta(\text{COO}^-)$), пиранозного

цикла ($\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{OC})$, $\delta(\text{CON})$, $\delta(\text{CCH})$, $\delta(\text{OCH})$ и $\delta(\text{CCO})$) и ацетамидной группы. Колебания ацетамидной группы проявляются в виде двух наборов линий (*т*-Амид I, *т*-Амид II и *т*-Амид III; *ц*-Амид I и *ц*-Амид II), соответствующих *транс*- и *цис*-конформациям ацетамидной группы.

транс-Конформациям ацетамидной группы, которая стабилизируется за счет внутримолекулярной водородной связи между NH-группой и C7-гидроксильной группой, характерна для свободных сиалозидов в растворе [19]. Появление *цис*-изомера при адсорбции можно объяснить тем, что для связывания остатков SA с поверхностью необходима C7-гидроксильная группа. При этом разрывается водородная связь этой группы с ацетамидной, и ацетамидный фрагмент может принимать как *транс*-, так и *цис*-конформацию. Соотношение интенсивности линий, соответствующих *транс*- и *цис*-колебаниям ацетамидной группы, в спектрах конъюгатов (Ia), (IIa) и (IIIa) (рис. 1а, 3) указывает на присутствие как *транс*-, так и *цис*-изомеров. В то же время для конъюгата (Iб) (рис. 1б) характерно доминирование *транс*-изомеров. Кроме того, для конъюгата (Iб) наблюдается появление линий 828, 806, 755, 730, 642, 600, 544 cm^{-1} , характерных для колебаний пиранозного кольца, что

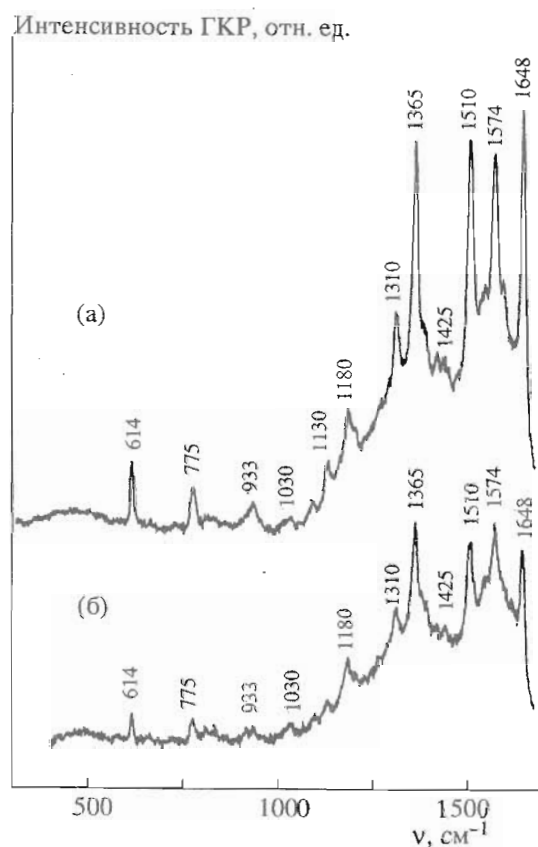


Рис. 3. Спектры ГКР неогликоконъюгатов (IIa) (а) и (IIIa) (б). Содержание сиаловой кислоты 25 мол. %. Концентрация конъюгатов по сиаловой кислоте 1 мМ.

указывает на сближенность пиранозного цикла SA с серебряной поверхностью.

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СИАЛИРОВАННЫХ ГЛИКОКОНЪЮГАТОВ НА ДОСТУПНОСТЬ И КОНФОРМАЦИОННУЮ СВОБОДУ ОСТАТКОВ SA

Как отмечалось выше, варьирование плотности остатков сиаловой кислоты на полимерном носителе меняет общую интенсивность спектра ГКР, но не влияет на вид спектра. Отсутствие изменений вида спектра указывает на неизменность геометрии адсорбции остатков SA, а интенсивность спектра увеличивается благодаря увеличению числа адсорбированных остатков SA. Как было показано ранее [11], введение заместителей в группы, участвующие в адсорбции SA-остатков, резко ухудшает их взаимодействие с поверхностью серебра, а также понижает способность сиалозидов связываться с НА вируса гриппа. Поскольку одни и те же молекулярные группы остатков SA важны как для адсорбции, так и для связывания с НА, изменения конформации остат-

ка SA, приводящие к экранированию одной или нескольких этих групп, будут ухудшать как адсорбцию, так и связывание с лектином. Наиболее очевидной причиной такого экранирования в случае полимеров могут быть взаимодействия соседних остатков SA. Вероятность таких взаимодействий возрастает по мере увеличения плотности сиалированных цепей на полимере. Уменьшение общей доступности остатков SA для адсорбции может происходить также при образовании компактной (по сравнению с развернутой) пространственной структуры сиалированного полимера.

Доля адсорбированных остатков SA зависит также от их конформационной свободы в составе конъюгата. При этом под конформационной свободой остатков SA понимается их способность подстраиваться к рельефу поверхности за счет конформационной подвижности сиалированных боковых цепей и основной цепи полимера-носителя.

Таким образом, спектроскопия ГКР применима для исследования общей доступности и конформационной свободы остатков SA в составе синтетических неогликоконъюгатов. Очевидно, что эти же факторы сходным образом влияют на эффективность связывания полимера с НА на поверхности вириона.

Следует особо отметить возможность использования спектроскопии ГКР для контроля однородности распределения SA вдоль цепи полимера, так как контролируемая однородность распределения, по-видимому, является одной из важных предпосылок высокой активности неогликоконъюгатов [4]. Собственный спектр ГКР полиакриловой кислоты (рис. 1в) сравним по интегральной интенсивности с наиболее интенсивными спектрами неогликоконъюгатов (рис. 1а). Следовательно, способность полимера к адсорбции на ГКР-активной поверхности через боковые карбоксильные группы не меньше, чем через остатки SA. Поэтому исчезновение характерного спектра полимерного носителя уже при небольшой плотности остатков SA указывает на высокую однородность распределения углеводных цепей вдоль основной цепи полимера.

Влияние структуры и жесткости основной полимерной цепи на спектр ГКР исследовали на примере гликоконъюгатов – производных полиакриловой кислоты (Ia), (IIa) и (IIIa) и полиакриламида (Iб). Зависимости изменения интенсивности сигнала ГКР этих конъюгатов от содержания SA значительно отличаются друг от друга (рис. 4 и 5).

Конъюгат на основе полиакриламида (Iб). Молекула немодифицированного PAA, а также PAA с малым содержанием SA представляет собой в растворе неупорядоченную глобулу. Рост числа остатков SA на поверхности глобулы по мере увеличения содержания сиаловой кислоты,

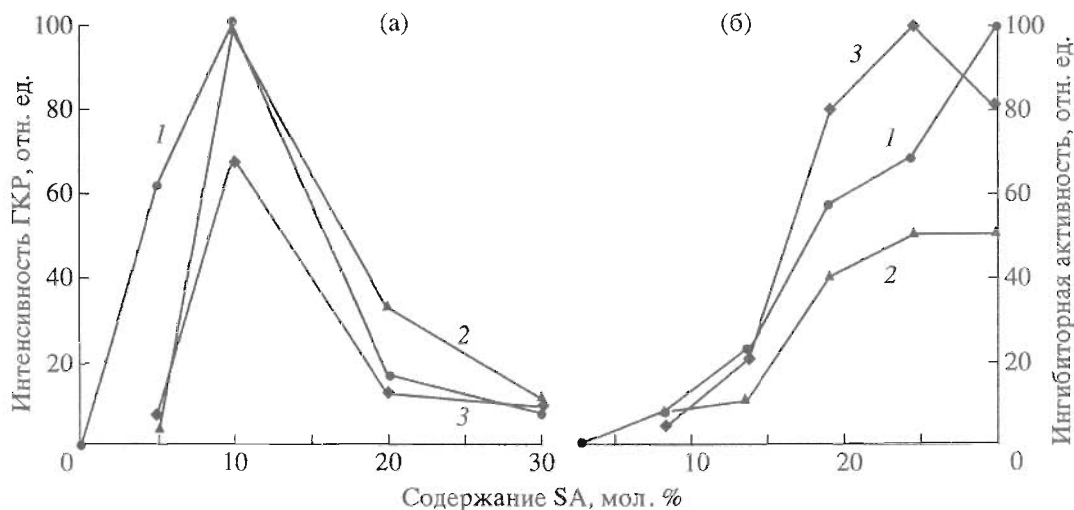


Рис. 4. Зависимости от содержания сиаловой кислоты интенсивности сигнала ГКР (а и б, кривые 1) и ингибиторной активности конъюгата (Ia) (а) по отношению к вирусу гриппа, штаммы A/Bangkok/1/79 (кривая 2) и A/Texas/1/77 (кривая 3) [2], и конъюгата (Ib) (б) по отношению к вирусу гриппа, штаммы A/26/90M (кривая 2) и B/48/90M (кривая 3).

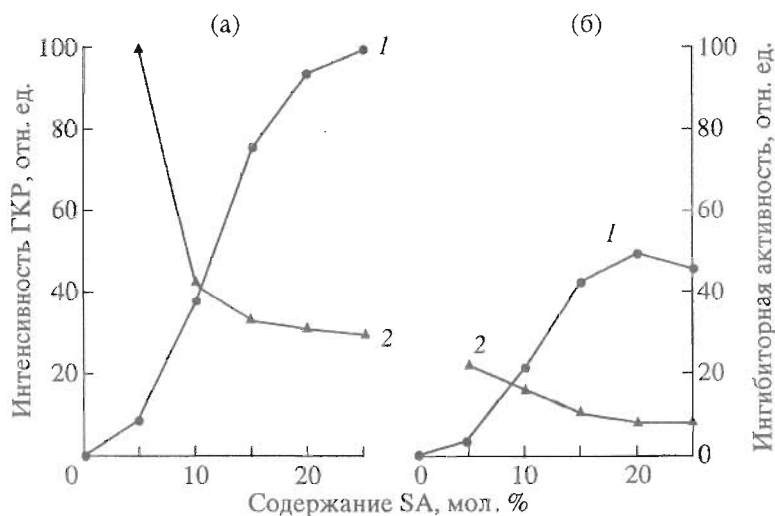


Рис. 5. Зависимости от содержания сиаловой кислоты интенсивности сигнала ГКР (кривая 1) и ингибиторной активности (кривая 2) конъюгатов (IIa) (а) и (IIIa) (б) по отношению к вирусам гриппа (штамм A/СССР/90/77).

а также в результате раскручивания глобулы из-за накопления заряженных групп наглядно определяется как нелинейное возрастание интенсивности сигнала ГКР (рис. 4б). Для полимера (Iб) по сравнению с конъюгатами на основе полиакриловой кислоты наблюдается некоторое изменение конформации остатков SA, что обнаруживается по усилению колебаний пиранозного цикла и значительному уменьшению доли *цис*-изомеров в адсорбированном состоянии. Эта особенность сохраняется для полимера (Iб) при различном содержании сиаловой кислоты.

Конъюгаты на основе полиакриловой кислоты (Ia), (IIa) и (IIIa). Благодаря заряду в РА поддерживается более развернутая по сравнению с РАА конформация цепи [4]. Для конъюгатов (IIa)

и (IIIa) на РА характерно монотонное возрастание интенсивности сигнала с ростом содержания сиаловой кислоты и выход зависимостей на плато при 15 мол. % для конъюгата (IIIa) и при 25 мол. % для конъюгата (IIa). Выход сигнала ГКР на плато, по-видимому, обусловлен двумя причинами: 1) жесткая структура полимерной цепи обеспечивает ограниченную область контакта с серебряной поверхностью, при этом конъюгат слабо подстраивается под локальную топологию поверхности; 2) жесткая структура полимера приводит к вынужденным взаимодействиям соседних сиалированных боковых цепей при увеличении их плотности и вследствие этого к искажению оптимальной для адсорбции ориентации остатков SA. Отметим, что перестройка гибкой глобулярной

структуры конъюгата (Iб) позволяет избежать этих неблагоприятных факторов при умеренном содержании остатков SA.

Для конъюгата (Iа) обнаружено резкое возрастание интенсивности сигнала ГКР при содержании сиаловой кислоты 10 мол. % (рис. 4а). При дальнейшем увеличении плотности остатков SA до 20–30 мол. % интенсивность ГКР также резко падает. Такая зависимость сигнала ГКР для (Iа) принципиально отличается от данных для двух других конъюгатов на основе РА (IIа, IIIа), что может быть связано с большей длиной и гибкостью асиаловой части боковой цепи конъюгата (Iа). Однозначно можно заключить, что при увеличении содержания остатков SA до 20 мол. % и более их общая доступность и/или конформационная свобода в составе полимера (Iа) резко уменьшаются.

Во многих природных олигосахаридных цепях присутствуют терминальные дисахариды Neu5Ac α 2-3Gal или Neu5Ac α 2-6Gal. Сравнение данных ГКР по серии полимерных конъюгатов (IIа) и (IIIа), содержащих такие фрагменты, показало, что в сравнении с (IIIа) сигнал ГКР конъюгата (IIа) выходит на насыщение при более высоком содержании сиаловой кислоты, а интенсивность его спектров приблизительно в 2 раза больше, чем для (IIIа). Очевидно, что различие в характере связи Neu5Ac α -Gal (2 \rightarrow 3 или 2 \rightarrow 6) не может существенно влиять на структуру и жесткость основной цепи полимера и быть причиной обнаруженных различий в спектрах. По-видимому, ориентация остатка SA в составе фрагмента Neu5Ac α 2-6Gal на полимере менее предпочтительна для взаимодействия с поверхностью по сравнению с Neu5Ac α 2-3Gal, а появляющиеся по мере роста плотности остатков SA контакты соседних углеводных цепей вызывают дополнительное искажение оптимальной для адсорбции конформации полимерных конъюгатов.

КОРРЕЛЯЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ СПЕКТРОСКОПИИ ГКР С ДАННЫМИ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Как было показано выше, спектроскопия ГКР позволяет оценить общую доступность и конформационную свободу остатков SA в составе синтетических неогликоконъюгатов. Чтобы оценить относительный вклад этих факторов в общую картину ингибирования, а также выявить влияние других специфических факторов, данные ГКР сопоставлены с результатами тестирования ингибиторской активности неогликоконъюгатов по отношению к вирусу гриппа.

Представленные на рис. 4а зависимости ингибиторской активности конъюгата (Iа), на примере штаммов A/Bangkok/1/79 и A/Texas/1/77 [2, 7], и интенсивности сигнала ГКР от содержания сиаловой

кислоты практически совпадают. Это свидетельствует о том, что доступность остатков сиаловых кислот и их конформационная свобода являются в данном случае основными факторами, определяющими ингибиторные свойства конъюгата.

В случае конъюгата (Iб) (рис. 4б) зависимость ингибиторной активности (по штаммам A/26/90M и B/48/90M) от содержания сиаловой кислоты характеризуется выходом на плато при 20 мол. %, в то время как сигнал ГКР продолжает расти. Отсутствие корреляции зависимостей сигнала ГКР и ингибиторной активности от содержания сиаловой кислоты свидетельствуют о наличии дополнительного фактора, значительно влияющего на ингибиторные свойства конъюгата. Одним из вероятных факторов может быть эффект стерической стабилизации (см. выше), возникающий благодаря гибкой глобулярной структуре полиакриламидного носителя. Вклад стерической стабилизации в общую картину ингибирования высок при малом содержании сиаловой кислоты, а с ростом ее содержания в конъюгате имеет тенденцию к уменьшению.

Ингибирование вируса штамма A/СССР/90/77 конъюгатами (IIа) и (IIIа) максимально при малой плотности остатков SA (рис. 5). С увеличением содержания сиаловой кислоты ингибиторная активность уменьшается и в диапазоне 15–25 мол. % практически не меняется. Сопоставление данных спектроскопии ГКР конъюгатов (IIа) и (IIIа) и результатов тестирования их ингибиторной активности позволяет предположить, что высокая активность конъюгатов при низком содержании сиаловой кислоты указывает на проявление специфического фактора, вклад которого в ингибирование оказывается определяющим. Таким фактором, как и в случае конъюгата (Iб) (рис. 4б), может служить стерическая стабилизация. Отличие для конъюгатов (IIа) и (IIIа) состоит в том, что максимальный эффект стабилизации достигается уже при низком содержании сиаловой кислоты. Дальнейшее увеличение числа остатков SA на полимере не меняет общей картины ингибирования.

Отметим, что как интенсивность ГКР, так и ингибиторная активность конъюгата (IIа) в области плато (15–25 мол. %) в 3–4 раза выше, чем для конъюгата (IIIа) (рис. 5). Сходный результат наблюдается для свободных олигосахаридов – соответствующих фрагментам боковых цепей конъюгатов (IIа) и (IIIа), Neu5Ac α 2-3Gal β 1- и Neu5Ac α 2-6Gal β 1-. Интенсивность сигнала ГКР первого в 1.5–2 раза выше, чем второго. Аналогично ингибирование штаммов A/СССР/90/77 (H1) и B/СССР/100/83 (B) олигосахаридом с терминацией Neu5Ac α 2-3Gal примерно в 3–5 раза выше, чем олигосахаридом с терминацией Neu5Ac α 2-6Gal [20].

Таким образом, спектроскопия ГКР сиалированных гликоконъюгатов позволяет оценить доступность для взаимодействия и конформационную свободу остатков SA, а также равномерность их распределения на полимерной цепи носителя. На основании сопоставления результатов спектрального анализа и тестирования активности гликоконъюгатов в ингибировании клеточной адгезии вируса гриппа можно сделать выводы о преобладании в этом процессе либо механизма конкурентного ингибирования, либо влияния стерической стабилизации для конкретного конъюгата и конкретного штамма вируса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сиалогликоконъюгаты (Ia), (Iб), (IIa) и (IIIa) получали присоединением сиалозидов с терминальной NH₂-группой к поли(4-нитрофенилакрилату) с последующей модификацией полимера этаноламином или NaOH по ранее описанному методу [7, 21]. Полученные полимеры на основе PA и PAA имели молекулярную массу ~30 кДа.

Методика получения ГКР-спектров описана в работе [11]. Спектры регистрировали с помощью КР-спектрометра (Jobin-Yvon Ramanog HG-2S, Франция). Для возбуждения использовали линию 514.5 нм аргонового лазера Spectra-Physics 164-03. Во всех экспериментах мощность излучения на образце составляла 30 мВт.

Коллоид серебра готовили путем восстановления азотнокислого серебра цитратом натрия по методике [22]. Перед записью ГКР-спектра 20 мкл разбавленного в 2 раза водой гидрозоля агрегировали добавлением 2 мкл 0.6 М NaClO₄ и смешивали с 20 мкл раствора исследуемого соединения в воде. Все приведенные в работе спектры ГКР были записаны при концентрации остатков SA в составе соединений, равной 1 мМ.

Вклад в спектры ГКР неогликоконъюгатов собственного спектра гидрозоля серебра (не показан) пренебрежимо мал и в расчетах не учитывался. Вклад в ГКР-спектры конъюгатов колебаний полимера-носителя оценивали по интенсивности линий 903 и 1240 см⁻¹ полиакриловой кислоты и по интенсивности линии 824 см⁻¹ полиакриламида. При расчетах интенсивности сигнала ГКР остатков SA вклад сигнала полимера-носителя вычитали, нормируя спектры по линиям 903 и 1240 см⁻¹ полиакриловой кислоты и по линии 824 см⁻¹ полиакриламида.

Зависимости интенсивности сигнала ГКР от содержания SA в конъюгате рассчитаны по интегральной интенсивности линии 1510 см⁻¹ и нормированы на максимум сигнала для каждого конъюгата, за исключением (IIIa). Зависимость для конъюгата (IIIa) нормирована на максимум сигнала конъюгата (IIa). Для измерения интегральной ин-

тенсивности линии 1510 см⁻¹ спектр ГКР в области 1100–1680 см⁻¹ раскладывали на составляющие его линии с использованием программы SPOV.

Зависимости ингибиторной активности неогликоконъюгатов от содержания SA построены по результатам работ [2–4, 7] и по данным (об ингибиторной активности сиалированных неогликоконъюгатов), предоставленным нам А.С. Гамбарян, М.Н. Матросович (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, неопубликованные результаты), за что авторы приносят им свою благодарность.

Работа выполнена при поддержке грантов Международного научного фонда (№ MPU300) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 96-04-48764).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reutter W., Koottgen E., Bauer C., Gerok W. // *Sialic Acids. Chemistry, Metabolism and Function, Cell Biology Monographs*. V. 10 / Ed. R. Shauer. Wien; New York: Springer-Verlag, 1982. P. 263–305.
2. Mochalova L.V., Tuzikov A.B., Marinina V.P., Gambaryan A.S., Byramova N.E., Bovin N.V., Matrosova M.N. // *Antivir. Res.* 1994. V. 23. P. 179–190.
3. Spaltenstein A., Whitesides G.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 113. P. 686–687.
4. Mammen M., Dahmann G., Whitesides G.M. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. P. 4179–4190.
5. Spevak W., Nagy J.O., Charych D.H., Schaefer M.E., Gilbert J.H., Bednarski M.D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 1146–1147.
6. Lees W.J., Spaltenstein A., Kingery W.J.E., Whitesides G.M. // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. P. 3419–3433.
7. Matrosova M.N., Mochalova L.V., Marinina V.R., Byramova N.E., Bovin N.V. // *FEBS Lett.* 1990. V. 272. P. 209–212.
8. Sokolov K.V., Byramova N.E., Mochalova L.V., Tuzikov A.B., Shiyani S.D., Bovin N.V., Nabiev I.R. // *Appl. Spectrosc.* 1993. V. 47. P. 535–538.
9. Nabiev I.R., Sokolov K.V., Manfait M. // *Biomolecular Spectroscopy. Part A*. V. 20 / Eds R.J.H. Clark, R.E. Hester. Chichester; New York; Brisbane, Toronto; Singapore: Wiley, 1993. P. 267–338.
10. Nabiev I.R., Sokolov K.V., Oleinikov V.A., Yanul A.I., Feofanov A.V., Shiyani S.D., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // *Int. Conf. "Biology and Chemistry of Sialic Acids"*. Abstracts. M., 1994. P. 16–18.
11. Феофанов А.В., Олейников В.А., Тузиков А.Б., Януль А.И., Крюков Е.Ю., Соколов К.В., Бовин Н.В., Набиев И.Р. // *Биоорг. химия*. 1996. Т. 22. С. 706–716.
12. Hildebrandt P., Stockburger M. // *J. Phys. Chem.* 1994. V. 88. P. 5935–5944.
13. Matrosova M.N., Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Byramova N.E., Mochalova L.V., Golbraikh A.A., Shegderovich M.D., Finne J., Bovin N.V. // *Virology*. 1993. V. 196. P. 111–121.

14. Pritchett T.J., Brossmer R., Rose U., Paulson J.C. // *Virology*. 1987. V. 160. P. 502–506.
15. Pritchett T.J., Paulson J.C. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 9850–9858.
16. Sauter N.K., Bednarsky M.D., Wursburg B.A., Hanson J.E., Whitesides G.M., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 8388–8396.
17. Sauter N.K., Hanson J.E., Glick G.D., Brown J.H., Crowther R.L., Seong-Joon P., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 9609–9621.
18. Kelm S., Paulson J.C., Rose U., Brossmer R., Schmid W., Bandgar B.P., Schreiner E., Hartmann M., Zbiral E. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 205. P. 147–153.
19. Czarniecki M.F., Thornton E.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 1977. V. 99. P. 8273–8279.
20. Gambaryan A.S., Piskarev V.E., Yamskov I.A., Sakharov A.M., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Nifant'ev N.E., Matrosovich M.N. // *FEBS Lett.* 1995. V. 366. P. 57–60.
21. 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. // *Glycoconjugate*. 1993. V. 10. P. 142–151.
22. Nabiev I.R., Sokolov K.V., Voloshin O.N. // *J. Raman Spectrosc.* 1990. V. 21. P. 333–336.

Study of Sialylated Neoglycoconjugates by Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy

A. V. Feofanov, V. A. Oleinikov, A. B. Tuzikov, A. I. Yanoul,
E. Yu. Kryukov, N. V. Bovin, and I. R. Nabiev

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

Abstract—Neoglycoconjugates based on polyacrylamide and sialic acid with *N*-acetylneuraminic acid or sialooligosaccharides as side chains were studied by surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy. It had previously been found that these polymers can effectively inhibit influenza virus adhesion. This study revealed the possibility to evaluate, based on the intensity of SERS signals, the overall availability for interaction and the conformational freedom of sialic acid residues in glycoconjugates. The dependence of these two factors on the structure and density of sialylated side chains was studied. The uniformity of distribution of sialylated side chains in conjugates was shown. Comparison of the results of the SERS spectroscopic study of the conjugates and the data on their inhibitory effect on the adhesion of specific strains of influenza virus allowed the identification of the conjugates for which the availability and conformational freedom of sialic acid are the main factors determining their inhibitory properties. A conclusion was also reached about the predominance of one of the mechanisms (competitive inhibition or steric stabilization) in the inhibitory properties of the specific conjugates.

Key words: sialic acids, sialooligosaccharides, polymeric sialosides, neoglycoconjugates, surface-enhanced Raman scattering spectroscopy