



УДК 547.458.41.057

© 1994 Н. Э. Нифантьев, Ю. Е. Цветков, А. С. Шапков, А. Б. Тузиков\*, И. В. Масленников\*, И. С. Попова\*, Н. В. Бовин\*

## РЕЦЕПТОРЫ СЕЛЕКТИНОВ

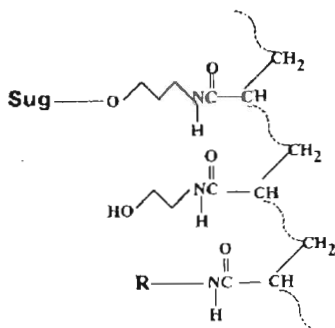
### 1. СИНТЕЗ ТЕТРАСАХАРИДОВ SiaLe<sup>a</sup> И SiaLe<sup>x</sup> И ИХ ПОЛИМЕРНЫХ КОНЬЮГАТОВ

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;

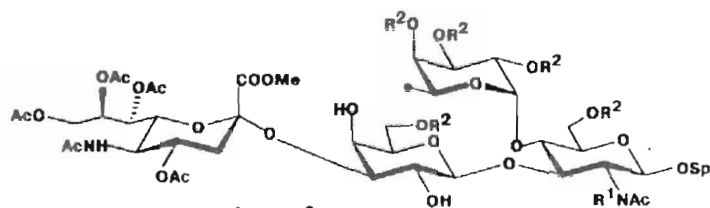
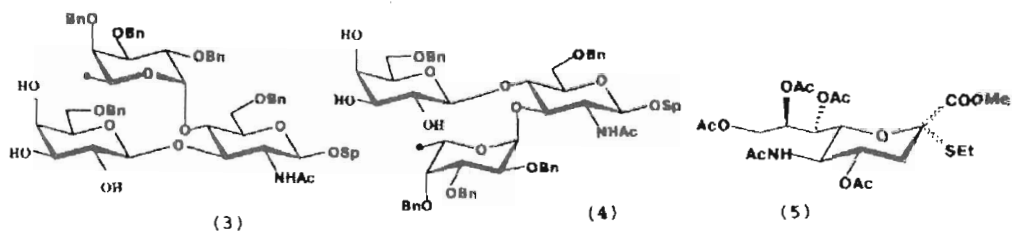
\*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: селектины, сиалоолигосахариды, SiaLe, клеточная адгезия, лектины опухолей, моноклональные антитела, спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния.

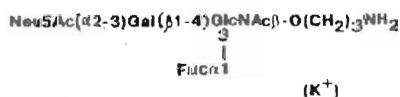
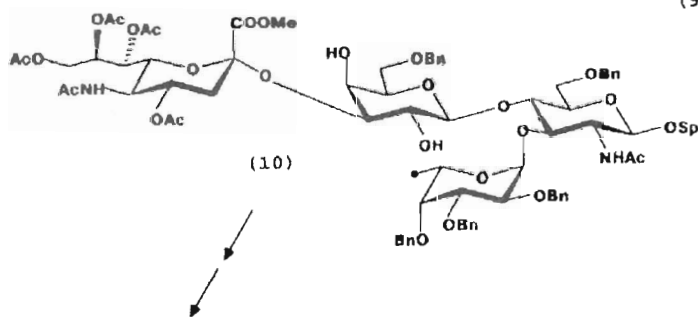
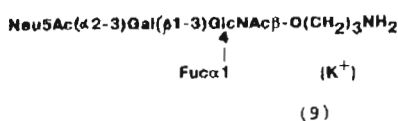
Исследование нового класса мембранных гликопротеинов, селектинов, — одно из наиболее интенсивно развивающихся направлений современной гликобиологии [1—3]. Интерес к селектинам вызван их участием в важнейших этапах первичного клеточного узнавания, инициирующих воспалительные, аллергические и многие другие процессы. Понимание механизма селектиноопосредованного взаимодействия открывает пути к созданию лекарственных препаратов нового поколения, действующих по принципу ингибирования межклеточной адгезии.



R	Sug	SiaLe <sup>a</sup>	SiaLe <sup>x</sup>
		Neu5Ac $\alpha$ (2-3)Gal $\beta$ (1-3)GlcNAc $\beta$ -	Neu5Ac $\alpha$ (1-3)Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc $\beta$ -
HO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -		1a	2a
Биотин-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -		1b	2b
Фосфатидил-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -		1c	2c



- (6)  $R^1 = H, R^2 = Bn$   
 (7)  $R^1 = SEt, R^2 = Bn$   
 (8)  $R^1 = R^2 = H$



(11)

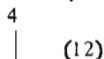
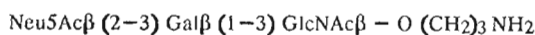
Клеточным рецептором селектинов (или одним из них) является тетрасахарид SiaLe<sup>x</sup>, однако специфичность углеводсвязывающего фрагмента для разных селектинов несколько различается [2] и требует дальнейшего изучения. Исследование тонкой специфичности селектинов, выявление их на клеточной мембране, изучение процессов экспрессии, кластеризации, взаимодействия с рецепторами и, наконец, шеддинга можно наиболее точно и надежно проводить, применяя синтетические рецепторы селектинов. В качестве таковых нами синтезированы спейсерированные тетрасахариды SiaLe<sup>a</sup> и SiaLe<sup>x</sup> (9) и (11), а также их конъюгаты с полиакриламидом (1a—в) и (2a—в). Отметим, что именно указанные сиалилированные олигосахариды являются наиболее общим структурным мотивом углеводных селектинсвязывающих молекул [2].

Вследствие высокой эффективности и селективности сиалилирования производных галактозы с незащищенными OH-группами в положениях 2, 3, 4 [4]

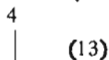
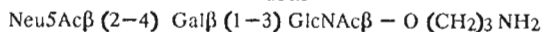
выбранная схема синтеза спейсерированных тетрасахаридов (9) и (11) включала в себя на завершающей стадии гликозилирование трисахаридных триолов (3) и (4) (синтез этих соединений будет описан отдельно) действием этил-2-тиосиалозида (5) в ацетонитриле в присутствии смеси N-йодсукцинимида и трифторметансульфокислоты. Гликозилирование триола (4) сиалил-донором (5) при  $-40^{\circ}\text{C}$  протекало эффективно и региоспецифично и привело к защищенному тетрасахариду SiaLe<sup>x</sup> (10) с выходом 74%. Каталитический гидронолиз (10) над Pd/C и последующее омыление дали целевой спейсерированный тетрасахарид SiaLe<sup>x</sup> (11), выделенный с помощью ВЭЖХ в виде K<sup>+</sup>-соли (выход 84%).

В отличие от триола (4) сиалилирование производного Le<sup>a</sup> (3) приводило к образованию целевого тетрасахарида (6) с выходом лишь 19%. Кроме этого соединения нами был получен и продукт его N-тиоэтилирования (7), выход которого составил 29%, а общий выход продуктов  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3)-сиалилирования 48%. N-SEt-группа в производном (7) легко удаляется в условиях гидронолиза в присутствии Pd/C. Так, каталитический гидронолиз соединений (6) и (7) количественно приводит к тетрасахариду (8), омылением которого далее был получен целевой спейсерированный тетрасахарид SiaLe<sup>a</sup> (9) в виде K<sup>+</sup>-соли (выход 76%).

Другая интересная особенность сиалилирования триола (3) — образование смеси изомерных лактонов с общим выходом 30%. Оказалось, что в лактонной смеси отсутствует продукт  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3)-сиалилирования, так как гидронолиз лактонной фракции и последующее омыление приводят главным образом к изомерным тетрасахаридам (12) и (13), тогда как образования тетрасахарида SiaLe<sup>a</sup> (9) не наблюдается.



Fucal



Fucal

Строение спейсерированных тетрасахаридов (9) и (11)—(13), в частности конфигурации аномерных центров и места замещения, установлены с помощью спектроскопии <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР. Так, замещение остатка Gal по O-3 в продуктах (9), (11) и (12) и по O-4 в (13) подтверждалось слабопольным расположением сигнала C-3Gal в спектрах <sup>13</sup>C-ЯМР соединений (9), (11) и (12) и C-4Gal в спектре (13) ( $\delta$  77,0, 77,0, 79,1 и 77,7 м. д.).  $\alpha$ -Конфигурация остатка Neu5Ac в олигосахаридах (9) и (11) и  $\beta$ -конфигурация в соединениях (12) и (13) установлена на основании характеристических [5] величин химических сдвигов сигналов H-3e в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР этих соединений ( $\delta$  2,69, 2,76, 2,49 и 2,43 м. д.) и КССВ J<sub>C-1,H-3a</sub> в спектрах <sup>13</sup>C-ЯМР (5,6, 5,9, < 1 и < 1 Гц).

Синтез гликоконъюгатов (1a—в) и (2a—в) проводили по разработанному ранее методу [6, 7]. Последовательным взаимодействием с поли(4-нитрофенил-акрилатом) и затем с этаноламином спейсерированные тетрасахариды (9) и (11) были переведены в полимерные продукты (1a) и (2a). Варьируя соотношение реагентов, получили полиакриламидные конъюгаты (псевдополисахариды), содержание олигосахаридных фрагментов в которых изменялось от 2 до 20 мольных % (19—67% весовых). Дополнительно вводя в реакцию б-аминогексиламид d-биотина либо фосфатидилэтанолламин [6], получали конъюгаты, содержащие биотинную метку (1б, 2б), а также фосфатидилэтанолламин (1в, 2в). Присутствие фосфатидилэтанолламина позволяет переводить конъюгаты в иммуногенную форму

для получения моноклональных антител, направленных на олигосахаридные фрагменты конъюгатов.

Тетрасахариды (9) и (11), а также их иммобилизованные формы (1а) и (2а) исследовались (совместно с д-ром Г. Вейтц-Шмидт (Dr. G. Weitz-Schmidt), Sandoz, Швейцария) как потенциальные ингибиторы селектинов. В частности, было найдено, что конъюгат (1а) эффективно и селективно ингибирует селектинопосредованное взаимодействие линии клеток HL-60 с эндотелиальными клетками (HUVEC) при действующей концентрации на два порядка ниже, чем в случае несвязанного тетрасахаарида (9) или конъюгата тетрасахаарида SiaLe<sup>a</sup> с бычьим сывороточным альбумином. Полимер (1а) использован в качестве специфического агента для сенсibilизации полистироловых планшет при создании иммуноферментной тест-системы для выявления Е-селектина.

С помощью биотинилированного конъюгата (1б) исследована поверхность серии раковых клеток, в том числе метастазирующих клеток, и показано наличие на них SiaLe<sup>a</sup>-связывающих молекул — селектинов или их опухолевых форм [8, 9]. При исследовании трансформированных клеток лейкемических пациентов таких молекул не было обнаружено.

Тетрасахариды (9) и (11) и их конъюгаты использованы для установления тонкой эпитопной специфичности шести моноклональных антител, полученных к рецепторам селектинов (зашифрованные антитела, получены с V Рабочего совещания по лейкоцитарным антигенам дифференцировки, 1993, Бостон, США). Изучено прямое связывание антител с конъюгатами (1а) и (2а), а также ингибирование связывания тетрасахааридами (9) и (11) и их ди- и трисахаридными фрагментами [10].

Тетрасахариды (9) и (11) и их конъюгаты (1а) и (2а) исследованы (совместно с М. Н. Матросовичем и А. С. Гамбарян, Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН России) как возможные ингибиторы адгезии вируса гриппа, опосредованной взаимодействием гемагглютинина вируса и сиалилированных олигосахаридов клетки-хозяина. Показано, что разветвленные тетрасахааридами (9) и (11), конформационная подвижность Neu5Ac-остатков в которых ограничена внутримолекулярными контактами, являются значительно менее активными ингибиторами, чем соответствующие линейные дефукосилированные трисахааридами. В отличие от ингибирования адгезии вируса гриппа синтезированные конъюгаты эффективно ингибируют клеточную адгезию патогенных микроорганизмов *Mycoplasma pneumoniae* (исследование проводилось совместно с И. Г. Скрипалем, Институт микробиологии и вирусологии АН Украины).

Тетрасахариды (9) и (11) исследованы (совместно с К. В. Соколовым и И. Р. Набиевым, Институт биоорганической химии РАН) с помощью спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) в условиях [11], позволяющих оценить степень доступности остатка Neu5Ac в сиалилированных олигосахааридах для взаимодействия с комплементарным партнером. В спектрах ГКР тетрасахааридов (9) и (11) наблюдаются более слабые сигналы в сравнении с таковыми в спектрах дефукосилированных трисахааридов, что свидетельствует о пространственной экранированности остатков Neu5Ac в разветвленных олигосахааридах (9) и (11) и хорошо согласуется с данными по их активности по отношению к вирусу гриппа (см. выше).

Авторы благодарят д-ра Г. Вейтц-Шмидт, д-ра биол. наук И. В. Абраменко, канд. хим. наук М. Н. Матросовича, д-ра биол. наук И. Г. Скрипалю и канд. хим. наук К. В. Соколова за предоставленные неопубликованные результаты.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bevilacqua M. P., Nelson R. M. // J. Clin. Invest. 1993. V. 91. P. 379—387.
2. Feizi T. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1993. V 3. № 5. P. 701—710.
3. Varki A. // Curr. Opinion Cell Biol. 1992. V. 4. P. 257—266.

4. Hasegawa A., Nagahama T., Ohki H., Hotta K., Ishida H., Kiso M.//J. Carbohydr. Chem. 1991. V. 10. № 3. P. 493—498.
5. Vliegthart J. F. G., Dorland L., van Halbeek H., Haverkamp J.//Cell Biology Monographs/Ed. R. Schauer. N. Y.: Springer-Verlag, 1982. V. 10. P. 127—172.
6. Bovin N. V., Korchagina E. Y., 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. № 2. P. 142—151.
7. Bovin N. V.//Lectins and Glycobiology//Ed. H.-J. Gabius, S. Gabius. B.: Springer-Verlag, 1993. P. 23—30.
8. Nifant'ev N. E., Shashkov A. S., Tsvetkov Y. E., Tuzikov A. B., Abramenko I. V., Gluzman D. F., Bovin N. V.//Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.: Synthetic Oligosaccharides: Indispensable Probes for Life Sciences/Ed. P. Kovac, 1994. In press.
9. Bovin N. V., Zemlyanukhina T. V., Tuzikov A. B., Tsvetkov Y. E., Shashkov A. S., Nifant'ev N. E., Abramenko I. V., Gluzman D. F.//Proc. of the XII International Symposium on Glycoconjugates. Krakow, 1993. P. 268—269.
10. Bovin N. V., Vlasova E. V., Galanina O. E., Khaidukov S. V., Tuzikov A. B., Tsvetkov Y. E., Nifant'ev N. E.//Proc. of the Vth International Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens, Boston, 1993. P. 260.
11. Sokolov K. V., Byramova N. E., Mochalova L. V., Tuzikov A. B., Shiyan S. D., Bovin N. V., Nabiev I. R.//Appl. Spectroscopy. 1993. V. 47. № 5. P. 535—538.

Поступило в редакцию 17.XI.1993

После доработки 7.II.1994

*N. E. Nifant'ev, Y. E. Tsvetkov, A. S. Shashkov, A. B. Tuzikov\*,  
I. V. Maslennikov\*, I. S. Popova\*, N. V. Bovin\**

#### RECEPTORS OF SELECTINS. 1. SYNTHESIS OF TETRASACCHARIDES SiaLe<sup>a</sup> AND SiaLe<sup>x</sup>, AND THEIR POLYMER CONJUGATES

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Moscow;*

*\* M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Spacer-armed tetrasaccharide Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc-sp (SiaLe<sup>a</sup>, sp = OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) was synthesized from 6-BnGlcNAc-sp with 6-BnAc<sub>3</sub>GalSEt, Bn<sub>3</sub>FucSEt, and Ac<sub>4</sub>Neu5AcSEt methyl ester as glycosyl donors. The final glycosylation of the trisaccharide bearing unprotected 2-, 3-, and 4-hydroxyls of galactose moiety was promoted with NIS-TfOH in MeCN, yield of  $\alpha$ -sialoside being 48% (29% as the N<sub>GlcNAc</sub>-SEt derivative). A mixture of  $\beta$ -connected (2—3) and (2—4) lactones was obtained as a side product (30%).

Tetrasaccharide Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc-sp (SiaLe<sup>x</sup>) was synthesized by a similar way starting from 6-Bn-3-MeOBnGlcNAc-sp; yield of  $\alpha$ -sialylation was 74%, neither N-SEt nor  $\beta$ -connected lactones were isolated.

Condensation of the spacers tetrasaccharides with poly(4-nitrophenylacrylate) gave N-substituted polyacrylamide-type polymers. Biotinylated probes and polymers modified with phosphatidylethanolamine (strong immunogens) were also obtained.

The unsubstituted and labelled polymeric derivatives were used for studying selectins and other lectins, as well as production and epitope characterization of monoclonal antibodies against sialooligosaccharides.