



УДК 577.112.853.014

© 1994 С. Д. Шиян, А. Л. Пухальский\*, А. П. Топтыгина\*,  
В. В. Насонов, Н. В. Бовин

### КОНЬЮГАТЫ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ $\alpha_1$ -КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА С ПОЛИАКРИЛАМИДОМ СОХРАНЯЮТ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИРОДНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА

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

*\* Медико-генетический центр РАМН, Москва*

Ключевые слова: гликоконъюгаты синтетические, иммуномодуляторы.

Предлагается метод переноса углеводных цепей гликопротеина на синтетическую матрицу, что позволяет изучать их вклад в биологическую активность гликопротеинов. N-Углеводные цепи  $\alpha_1$ -кислого гликопротеина (АГП) были аминированы по восстанавливающему остатку GlcNAc и присоединены к активированному полиакрилату таким образом, чтобы конъюгат (N-замещенный полиакриламид) имитировал АГП по молекулярной массе (44 кДа) и содержанию углеводов (40%). Полученные синтетические конъюгаты, идентичные АГП по соотношению сиалилированных четырех-, трех- и двухантенных цепей лактозаминового типа, ингибировали пролиферацию лимфоцитов в той же концентрации, что и природный гликопротеин. Таким образом, способность АГП ингибировать пролиферацию лимфоцитов обусловлена его углеводными цепями, а пептидный кор служит носителем, обеспечивающим поливалентное взаимодействие углеводов цепей с клетками.

Ряд гликопротеинов, таких, как  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин (АГП) [1, 2],  $\alpha$ -фетопротеин [3, 4], гаптоглобин [5], уромодулин [6, 7], гликопротеин Тамма — Хорсфалла [8], эпигликанин [9], обладают иммуномодулирующей активностью, т. е. способностью подавлять или усиливать пролиферацию лимфоцитов. В некоторых случаях с помощью энзиматической или химической избирательной деградации удалось однозначно показать, что носителем иммуномодулирующей активности гликопротеинов является: 1) пептидная часть молекулы, 2) совокуп-

Сокращения: АГП —  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин, ПАА — полиакриламид, ОС — олигосахариды, АМК — 7-амино-4-метилкумарин, ФГА — фитогематинотинин.

Адрес для переписки: 117871, Москва, ул. Миклушко-Маклая, 16/10, ИБХ РАН, лаборатория химии углеводов, С. Д. Шиян.

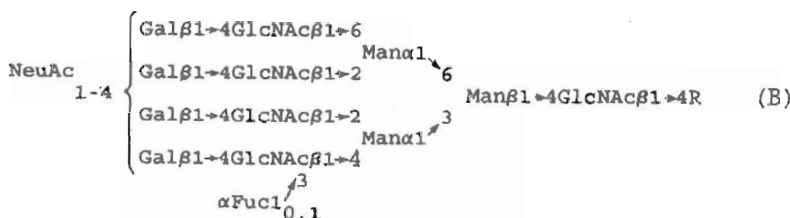
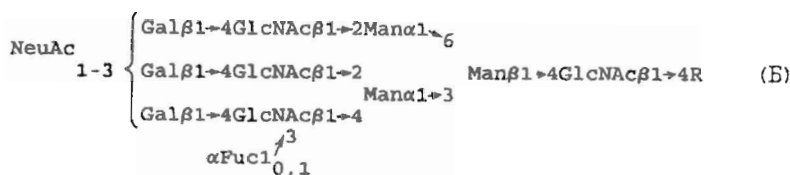
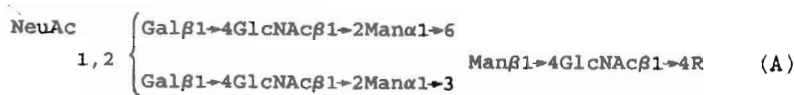
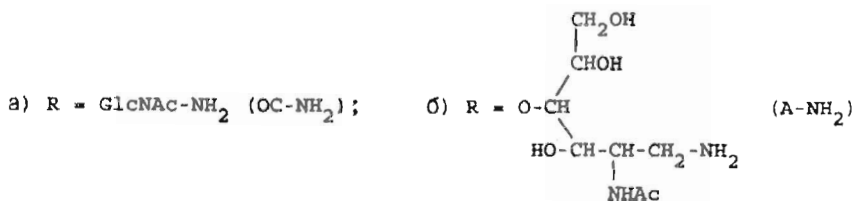


Рис. 1. Структуры углеводных цепей

ность пептидной и углеводной, 3) только углеводная. Так, углеводные цепи уромодулина, отщепленные от белкового кора, сохраняют иммуносупрессивную активность [6, 7]. В принципе можно представить и другие ситуации, уточняющие случай 3, например: 4) только гликаны непосредственно взаимодействуют с рецептором, а белковая часть обеспечивает необходимое взаимное их расположение, 5) для контакта гликанов с рецептором не обязательно их строго заданное взаимное расположение, а пептидный кор обеспечивает лишь поливалентность взаимодействия.

В данной работе предлагается подход, позволяющий подтвердить (или опровергнуть) последнее предположение. Подход заключается в количественном отщеплении всей суммы углеводных цепей гликопротеина, переносе их на синтетическую матрицу и изучении биологической активности полученного «неогликопротеина» в сравнении с природным.

Подход разрабатывали на примере  $\alpha_1$ -кислого гликопротеина (АГП), который относится к так называемым белкам острой фазы и является природным иммуномодулятором [1, 2]. В частности, АГП ингибирует пролиферацию лимфоцитов, причем данная активность является углеводзависимой, так как различно гликозилированные формы АГП различаются по антипролиферативной способности [1, 10—12]. АГП имеет пять сайтов гликозилирования, его углеводные цепи представлены сialiлированными четырех- (В), трех- (Б) и двухантенными (А) N-цепями лактозаминового типа в соотношении 50 : 40 : 10 [13]. Молекулярная масса АГП 44 кДа, весовое содержание углеводов около 40% [1]. В предвари-

тельных опытах нами было показано, что отщепленные углеводные цепи АГП обладают способностью подавлять пролиферацию лимфоцитов, хотя и заметно слабее, чем сам гликопротеин.

Сиалилированные углеводные цепи АГП (рис. 1 А—В) отщепляли в виде свободных ОС с помощью щелочного  $\text{LiBH}_4$  [13, 14] или гидразинолизом [14, 15]. Соотношение углеводных цепей разной антенности (А—В, рис. 1) и содержание тетра-, три-, ди- и моносиалоолигосахаридов в полученных смесях оценивали с помощью ВЭЖХ (см. «Экспериментальную часть»); оно соответствовало литературным данным для АГП. Для получения синтетических конъюгатов ОС с полиакриламидом (СК) использовали метод [16], разработанный для конденсации  $\epsilon$ -аминоалкилгликозидов ОС с поли(4-нитрофенилакрилатом), который позволяет присоединять аминопроизводные ОС к полимеру с количественным выходом вплоть до 30 мол.%. Это обстоятельство в данном случае принципиально, так как гарантирует такое же соотношение углеводных цепей в СК, как и в природном гликопротеине. Непрореагировавшие активированные группы полимера при этом превращаются в  $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ -группы.

Производные ОС с аминогруппой по восстанавливающему концевому остатку  $\text{GlcNAc}$ , необходимые для иммобилизации на поли(4-нитрофенилакрилате), получали двумя способами:

1) свободные ОС превращали в соответствующие гликозиламины ( $\text{OS-NH}_2$ ) в насыщенном растворе  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$  по методу [17]; при этом концевой остаток  $\text{GlcNAc}$  сохранял природную пиранозную форму (рис. 1а). Использовали также  $\text{OS-NH}_2$ , образующиеся при отщеплении углеводных цепей по методу [14], которые выделяли хроматографией на сефадексе G-15 в 10% водном этаноле;

2) восстановительное аминирование ОС смесью  $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{NaCNBH}_3$  по методу [18] приводило к соответствующим аминокальдитолам ( $\text{A-NH}_2$ ) (рис. 1б). Ожидалось, что эти производные могут быть более удобны для присоединения к полимеру, чем гликозиламины, благодаря их стабильности и большей реакционной способности аминогруппы, в то же время восстанавливающее звено  $\text{GlcNAc}$  в аминокальдитолах раскрыто, т. е. теряет природную пиранозную форму.

Углеводные цепи АГП в виде  $\text{OS-NH}_2$  или  $\text{A-NH}_2$  конденсировали с полиакрилатом. Для того чтобы сравнение биологической активности синтетического и природного веществ было максимально корректным, мы стремились к получению СК с молекулярной массой, близкой АГП (44 кДа), и содержанием углеводов около 40%. Необходимые параметры задавались молекулярной массой исходного полиакрилата и соотношением полимер — ОС. В результате нами были получены СК с содержанием углеводов (по весу) 19 (СК1), 30 (СК2) и 41% (СК3) для производных  $\text{A-NH}_2$ , а в случае  $\text{OS-NH}_2$  конъюгат с содержанием углеводов 30% (СК4).

Реальное содержание углеводов в СК определяли ВЭЖХ после гидролиза, как описано ранее для АГП [13, 15]. Конденсация проходила почти количественно в пересчете на  $\text{OS-NH}_2$ ; соотношение моносахаридов в СК соответствовало таковому в АГП. Относительная молекулярная масса СК3, определенная с помощью гель-фильтрации, была около 50 кДа. Таким образом, 40% «псевдо-АГП» (СК3) по углеводному составу и размеру молекулы соответствовал природному гликопротеину.

Иммунотормозящая активность АГП и имитирующих его СК была изучена на модели пролиферативного ответа лимфоцитов периферической крови человека на фитогемагглютинин (ФГА) [12] в широком диапазоне концентраций СК (от 0 до 1000 мкг/мл). Оказалось, что конъюгаты углеводных цепей АГП с полиакриламидом так же, как и сам АГП, обладают выраженным дозозависимым тормозящим эффектом на пролиферативный ответ лимфоцитов в культуре (рис. 2, 1—5). Для производных аминокальдитов ( $\text{A-NH}_2$ ) ингибиторный эффект СК с разным содержанием углеводов увеличивался в ряду СК1, СК2 и СК3, максимум достигался для СК3, наиболее близкого АГП по содержанию углеводов (рис. 2б,

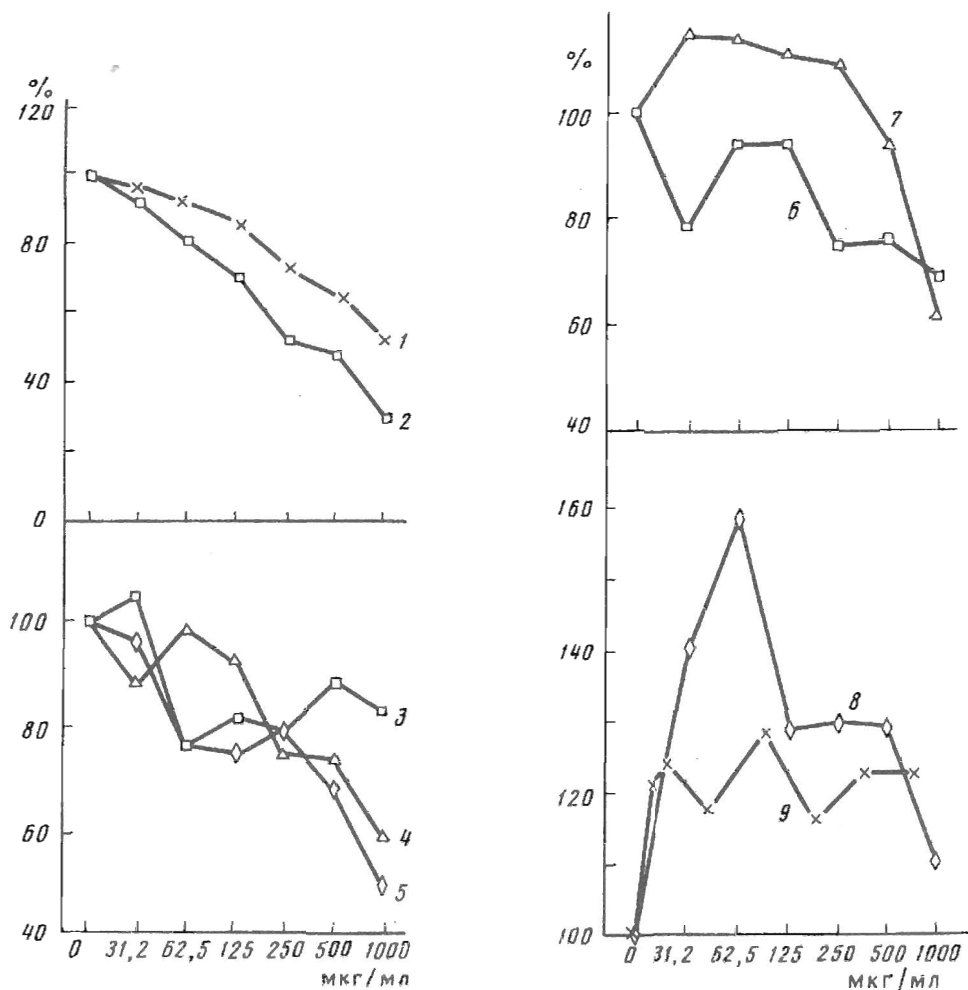


Рис. 2. Влияние на пролиферативный ответ лимфоцитов АГП (1), СК4 (2), СК1 (3), СК2 (4), СК3 (5), СК5 (6), СК6 (7), ПАА-конъюгатов с GlcNAc (8) и Le<sup>x</sup> (9)

кривая 5). СК4 (30% конъюгат гликозиламинов с ПАА) ингибировал пролиферативный ответ лимфоцитов сильнее, чем СК1, СК2, СК3 и даже сам АГП (рис. 2, 2).

Последний факт выглядит неожиданным, так как ОС-NH<sub>2</sub> отличаются от А-NH<sub>2</sub> только формой (циклической или восстановленной) «внутреннего» остатка GlcNAc, а взаимодействие гликанов АГП с лимфоцитами происходит с участием «внешних» углеводных остатков [1, 10—12]. Необходимо, однако, отметить, что, согласно данным теоретического конформационного анализа N-цепей, Asp-связанный остаток GlcNAc играет заметную роль в конформации полиантенных гликанов [19]: взаимодействуя со следующим остатком GlcNAc, он влияет на величину угла между моносахаридными остатками «маннозной вилки» и тем самым на расстояние между антеннами.

Найденные различия в иммуномодулирующей активности СК с ОС-NH<sub>2</sub> и А-NH<sub>2</sub> поставили вопрос о вкладе отдельных фрагментов углеводных цепей АГП и СК во взаимодействие с клетками и о их влиянии на иммуносупрессивные свойства СК. Поэтому кроме конъюгатов углеводных цепей АГП с полиакриламидом в опытах по влиянию на пролиферацию лимфоцитов были исследованы также конъюгаты ПАА с GlcNAc, GlcNAcβ1-4GlcNAc (хитобиоза), Galβ1-4(Fucα1-

3)GlcNAc (Le<sup>x</sup>), SiaLe<sup>x</sup> и некоторыми моносахаридами (при содержании углеводов 10 мол.%). Последние (в том числе СК с SiaLe<sup>x</sup>) практически не влияли на пролиферацию лимфоцитов (данные не приводятся). Конъюгаты с GlcNAc и Le<sup>x</sup> оказывали стимулирующее, а не ингибирующее действие на пролиферативный ответ лимфоцитов (рис. 2, 8, 9). В то же время СК с хитобиозой при низкой концентрации стимулировали, а при дозе выше 250 мкг/мл ингибировали пролиферативный ответ лимфоцитов и в этом отношении были похожи на сам АГП (рис. 2, 6, 7).

Таким образом, изученные фрагменты углеводных цепей АГП оказывали различное, в том числе и противоположное АГП, действие. Можно заключить, что иммуносупрессивная активность АГП определяется всей суммой его углеводных цепей и в значительной степени связана с коровой частью (хитобиозный блок) и кооперативным эффектом разветвленных N-углеводных цепей. В дальнейшем нам представляется важным выяснить роль отдельных углеводных цепей (двух-, трех- и четырехантенных), в том числе разной степени достроенности (десиаилированных, дефукозилированных и дегалактозилированных) во взаимодействии с лимфоцитами, с тем чтобы оценить их вклад в биологическую активность гликопротеина.

### Экспериментальная часть

ВЭЖХ на С18 проводили как в работе [13]. Соотношение четырех-, трех- и двухантенных цепей в ОС АГП было примерно 50 : 40 : 10.

*Сиалосодержащие ОС* анализировали в виде флуоресцентномеченых АМК-ОС ионообменной ВЭЖХ на колонке (8 × 250 мм) «TESSEK» (HEMA-B10 1000-Q, ЧСФР); использовали ступенчатый градиент NaCl в воде (за 50 мин, скорость 1,5 мл/мин): А — вода, Б — 0,5 М NaCl; элюировали: 1) водой А (5 мин), 2) 0 → 10% Б (15 мин), 3) 10% Б (10 мин), 4) 10 → 100% Б (20 мин). Соотношение тетра-, три-, ди- и моносиалоолигосахаридов, определенное флуориметрически, составляло 14 : 44 : 36 : 6.

*ТСХ проводили* на пластинках с силикагелем (60F-254, Merck) в системе этанол — пиридин — вода — уксусная кислота, 3 : 1 : 1 : 0,3; углеводы проявляли 5% водным раствором серной кислоты при 150° С, аминопроизводные — 5% раствором нингидрина. Углеводы в растворе определяли фенол-сернокислотным методом как в [14, 15].

*Моносахаридный состав* СК и ОС определяли офВЭЖХ АМК-производных после кислотного гидролиза и ре-N-ацетилирования, как описано ранее [15]; для определения содержания углеводов добавляли внутренний стандарт — ManNAc-AMC.

*АГП выделен* А. Г. Лютовым (НПО «Иммунопрепарат», Уфа) из донорской крови по методике [13]; олигосахариды АГП (ОС) получены гидразинолизом АГП или его гликопептидов, как описано в работе [13].

*Гликозиламины олигосахаридов* получали как в работе [17]: 10 мг смеси ОС растворяли в 1 мл насыщенного раствора (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>, перемешивали 6 сут при 30° С, разводили водой и лиофилизовали ОС-NH<sub>2</sub> трижды из 5 мл воды для удаления солей.

*ОС-NH<sub>2</sub>*, полученные при обработке АГП LiOH — LiBH<sub>4</sub> [13, 14], выделяли хроматографией на сефадексе G-15 (500 мл, 10% водный этанол) и дауэксе 50W-X2 (10 мл): ОС элюировали водой, ОС-NH<sub>2</sub> — 0,6 М NH<sub>4</sub>OH.

*Аминоальдитолы (A-NH<sub>2</sub>)* [18]. К раствору 20 мг ОС в 1 мл смеси DMF — MeOH (1 : 3) прибавляли 30 мг NH<sub>4</sub>OAc и 10 мг NaCNBH<sub>3</sub>, перемешивали 2 сут при 20° С, осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 3 мл воды, обрабатывали 1 ч дауэксом 50W-X2 (H<sup>+</sup>) и хроматографировали на колонке с тем же катионитом (5 мл), элюируя сначала водой (ОС), а затем 0,6 М NH<sub>4</sub>OH (A-NH<sub>2</sub>). Объединенные фракции упаривали и лиофилизовали.

Конъюгаты олигосахаридов с полиакриламидом (СК) получали по методу [16]: к раствору 25 мг поли(4-нитрофенилакрилата) в 0,5 мл DMF прибавляли раствор рассчитанного количества (2—10 мг) А-NH<sub>2</sub> или ОС-NH<sub>2</sub> в 1 мл DMF и 200 мкл диизопропилэтиламина и оставляли на 2 сут при 37° С, после чего прибавляли 150 мкл 30% раствора NH<sub>4</sub>OH (10-кратный мольный избыток по отношению к полиакрилату) и выдерживали ночь при 20° С, затем хроматографировали на колонке с сефадексом LH-20 (100 мл) в 50% водном ацетонитриле; растворители отгоняли в вакууме, водный раствор ПАА-ОС лиофилизировали. Выход 90%.

Аминоальдитол хитобиозы получен восстановительным аминированием [18] хитотриозы, как описано для А-NH<sub>2</sub> выше. Из него получены СК5 и СК6 (конъюгаты ПАА с хитобиозой, содержание углеводов 5 и 9%).

Конъюгаты ПАА с GlcNAc, Le<sup>x</sup> и SiaLe<sup>x</sup> (содержание углеводов 10 мол.%) получены как описано ранее [16] (сахариды в этом случае связаны с полимером через спейсер —CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—).

Пролиферативный ответ лимфоцитов периферической крови человека на ФГА в присутствии СК исследовали по включению [<sup>3</sup>H]тимидина, как описано нами ранее [12]. Мононуклеарные клетки выделяли градиентным центрифугированием в смеси фиколл — верографин, отмывали PBS (рН 7,2), суспензировали в среде RPMI-1640 (ICN, Англия), содержащей 10% инактивированной сыворотки лошади, 2 мМ НЕРЕС, 2 мМ L-глутамин, 2,8 мМ 2-меркаптоэтанол и 20 мкг/мл гентамицина. Клетки (10<sup>6</sup>/мл) культивировали в 96-луночных планшетах (Nunc, Дания) в объеме 200 мкл, стимулировали ФГА (5 мкг/мл), прибавляли СК (0—1 мг/мл) и инкубировали 72 ч во влажной атмосфере с 5% СО<sub>2</sub>. За 4 ч до конца инкубации в каждую лунку прибавляли [<sup>3</sup>H]тимидин (40 кБк на лунку) и по окончании культивирования оценивали радиоактивность. Обсчет кривых проводили по методу пробитов [12].

Работа поддержана грантом РФФИ 93-04-6256.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennet M., Schmid K.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 10. P. 6109—6113.
2. Cheresch D. A., Haynes D. H., Distasio J. A.//Immunology. 1984. V. 51. P. 541—548.
3. Zimmerman E. F., Vorting-Hawking M., Michael J. G.//Nature. 1977. V. 265. P. 354—356.
4. Yachnin S.//Ann. N. Y. Acad. Sci. 1983. V. 417. P. 105.
5. Okumura Y., Kudo J., Ikuto T.//Inflammation. 1985. V. 9. № 2. P. 211—219.
6. Muchmore A. V., Decker J. M.//Science. 1985. V. 229. P. 479.
7. Muchmore A. W., Shifrin S., Decker J. M.//J. Immunol. 1987. V. 138. P. 2547—2553.
8. Yu C. L., Lin W. M., Liao T. S., Tsai C. Y., Sun K.-H., Chen K. H.//Immunopharmacology. 1992. V. 24. P. 181—190.
9. Fung P. Y. S., Longenecker B. M.//Cancer Res. 1991. V. 51. P. 1170—1176.
10. Pose O., Oostendorp R. A. J., Van der Stelt M. E., Scheper R. J., Van Dijk W.//Inflammation. 1990. V. 4. P. 133—141.
11. Shiyan S. D., Nasonov V. V., Bovin N. V., Medvedev A.//Exp. Oncol. 1993. V. 15. № 2. P. 45—51.
12. Пухальский А. Л., Топтыгина А. П., Калашникова Е. А., Шиян С. Д., Насонов В. В., Бовин Н. В., Лютов А. Г., Байрушин Ф. Т.//Бюл. экспер. биол. и мед. 1994. в печати.
13. Шиян С. Д., Насонов В. В., Бовин Н. В., Новикова Л. И., Аleshkin В. А.//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 663—670.
14. Likhocherstov L. M., Novikova O. S., Piskarev V. E., Trusikhina E. E.//Carbohydr. Res. 1988. V. 178. № 1. P. 155—163.
15. Shiyan S. D., Nasonov V. V., Bovin N. V., Novikova L. I., Aleshkin V. A., Lutov A. G.//Exp. Onkol. 1993. V. 15. № 5. P. 53—61.
16. 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.



17. Manger J. D., Rademacher T. W., Dwek R. A.//Biochemistry. 1992. V. 31. P. 10724—10732.  
18. Honda S., Suzuki K., Suzuki S., Kakehi K.//Anal. Biochem. 1988. V. 169. P. 239—245.  
19. Липкин Г. М. Конформационный анализ углеводных цепей: Дис. д-ра хим. наук: М.: Ин-т орган. химии им. Н. Д. Зелинского, 1991.

Поступила в редакцию  
1.III.1994

*S. D. Shiyon, A. L. Puhalsky\*, A. P. Toptigina\*,  
V. V. Nasonov, N. V. Bovin*

**CONJUGATES OF CARBOHYDRATE CHAINS OF  $\alpha_1$ -ACID  
GLYCOPROTEIN WITH POLYACRYLAMIDE RETAIN THE  
IMMUNOMODULATING ACTIVITY**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow;  
\* Medical-Genetic Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

Key words: neoglycoconjugates synthetic, immunomodulators,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein N-chains.

Translocation of carbohydrate glycoprotein N-chains onto soluble polyacrylamide was proposed as a method for studying the biological role of carbohydrate chains. N-linked carbohydrate chains of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP) were aminated at the reducing GlcNAc moiety and covalently attached to polyacrylamide (PAA). Thus «pseudo-AGP» was obtained where peptide core was replaced with PAA. The synthetic model mimics AGP by  $M_r$  and carbohydrate content as well as the ratio of tetra-, tri- and diantennary and mono-, di-, tri- and tetrasialo chains. It was shown that the conjugate inhibits proliferation of lymphocytes like the parent AGP. Therefore, the property of AGP to inhibit the lymphocyte proliferation is attributed to its carbohydrate chains, whereas peptide core serves as carrier providing polyvalent interaction of multiple carbohydrate chains with cell.