

Кононов Леонид Олегович

**ХИМИЯ УГЛЕВОДОВ И
ГЛИКОБИОЛОГИЯ**

<https://углеводы.su>

Добрый день!

Лекция 7 Медицинская гликобиология

Патологии, ассоциированные с углеводами и углевод-
связывающими белками

6. *Essentials of glycobiology*, A. Varki, et al. (Eds.), 3d edn., 2017, Ch. 41–47, 55, 57, 58.
22. *Glycoscience and Microbial Adhesion*, T. K. Lindhorst, S. Oscarson (Eds.), 2009, 186 pp.
25. *Carbohydrates as Drugs*, P. H. Seeberger, C. Rademacher (Eds.), 2014, 237 pp.
28. S. Hakomori. *Chem. Phys. Lipids*. **1986**, *42*, 209-233.
29. D. A. Cumming. *Glycobiology* **1991**, *1*, 115-130.
37. M. von Itzstein. *Nature Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 967-974.
44. B. Ernst, J. L. Magnani. *Nature Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 661-677.
45. P. Stallforth, B. Lepenies, A. Adibekian, P. H. Seeberger. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5561-5577.
47. R. D. Astronomo, D. R. Burton. *Nature Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 308-324.
56. Д. С. Ньюбург. *Биохимия* **2013**, *78*, 990-1007.
59. F. Peri. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4543-4556.
60. T. R. Branson, W. B. Turnbull. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4613-4622.
61. A. Bernardi, et al. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4709-4727.
63. A. P. Corfield. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1850*, 236-252.

Сегодня мы будем обсуждать проблемы медицинской гликобиологии.

Литература довольно обширна, но основное опять же можно найти в книге №6

Начнем с рассмотрения патологий, ассоциированных с углеводами и углевод-связывающими белками.

Медицинская гликобиология

Болезни, связанные с деградацией углеводов

Известен ряд болезней, которые связаны с деградацией углеводов.

Гликопротеин-деградирующие ферменты

4

- Экзо-гликозидазы (Fuc-, Gal-, Neu5Ac- etc.)
- Эндо-ферменты N-цепей (endo-H, endo-F, endo-D, etc.):
 - Гликоамидазы (связь OS-NH → Asn)
 - GlcNAc-азы (связь GlcNAc → GlcNAc-Asn)
 - Gal-азы (связь Gal1 → 4GlcNAc комплексных ОС)
- O-гликопротеиназы (пептидные связи вблизи и между O-цепями)
- Эндо-гликозидазы O-цепей (связь GalNAc → Ser/Thr)

На слайде представлены гликопротеин-деградирующие ферменты:

- Прежде всего это экзо-гликозидазы, которые отщепляют терминальные моносахаридные остатки, например фукозидаза, отщепляющая остатки фукозы, галактозидаза – остатки галактозы, сиалидазы – остатки N-ацетилнейраминовой кислоты, и т.д. (Fuc-, Gal-, Neu5Ac- etc.)
- Для деградации N-цепей известны эндо-ферменты N-цепей, кодируемые латинскими буквами (endo-H, endo-F, endo-D, etc.).

При этом выделяют гликоамидазы, которые расщепляют амидную связь между карбоксильной группой остатка аспарагиновой кислоты и аминогруппой, присоединенной к восстанавливающему концу олигосахарида.

GlcNAc-азы, расщепляющие гликозидную связь между остатком N-ацетилглюкозамина и вторым остатком N-ацетилглюкозамина, находящимся в коре N-цепей

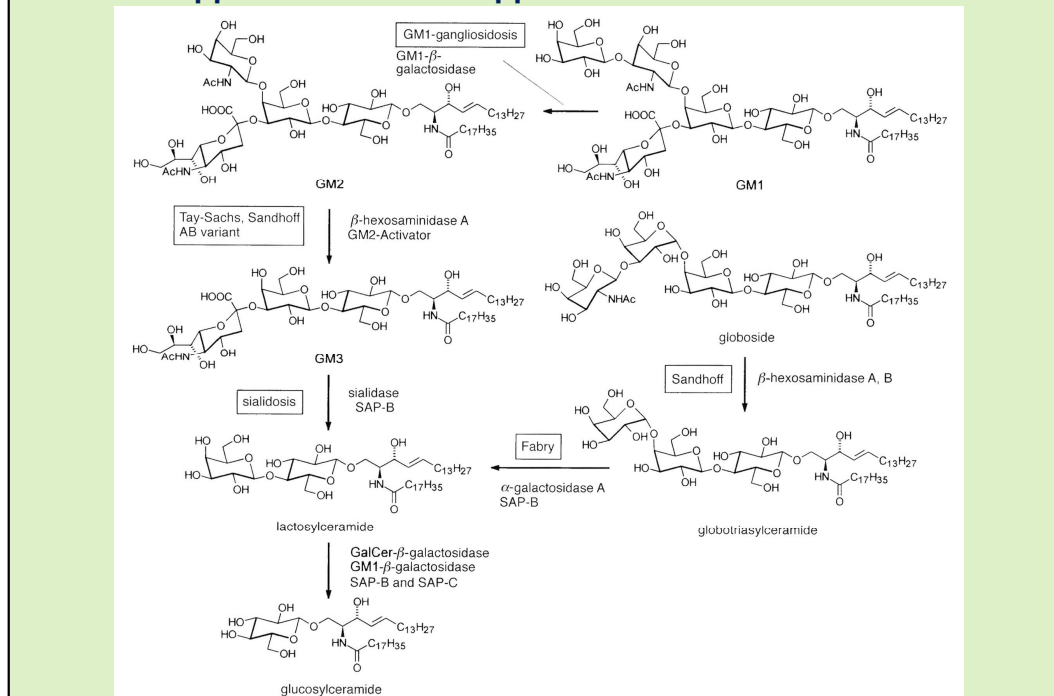
Галактозидазы, которые расщепляют связь между остатками галактозы и N-ацетилглюкозамина в лактозаминных цепях комплексных олигосахаридных цепей.

- O-гликопротеиназы, которые расщепляют пептидные связи вблизи и между O-цепями и полипептидной цепью

- Эндо-гликозидазы O-цепей расщепляют связь между остатком N-ацетилгалактозамина и остатком серина или треонина

Дегградация гликофинголипидов: гликозидазы и гликозидозы

5



Известны ферменты, осуществляющие дегградацию гликофинголипидов: Гликозидазы, которые расщепляют гликозидные связи между моносахаридными остатками в углеводной цепи гликофинголипидов. При этом нарушение дегградации какого-либо олигосахаридного фрагмента приводит к его накоплению, что обуславливает развитие патологии. Такое состояние, ассоциируемое с отсутствием гликозидаз или снижением их активности, приводящее к патологии, навывается гликозидоз (сиалидоз, вызванная нехваткой сиалидазы, болезнь Сандхоффа, вызванная дефицитом гексозаминидазы).

Дефекты деградации гликопротеинов и гликолипидов: гликозидозы

6

Disorder	Defect	Glyco-protein	Glyco-lipid	Clinical symptoms
α -Mannosidosis (types I and II)	α -mannosidase	major	none	<i>type I</i> : infantile onset, progressive mental retardation, hepatomegaly, death between 3 and 12 years <i>type II</i> : juvenile/adult onset, milder, slowly progressive
β -Mannosidosis	β -mannosidase	major	none	severe quadriplegia, death by 15 months in most severe cases; mild cases have mental retardation, angiokeratoma, facial dysmorphism
Aspartylglucosaminuria	aspartyl-glucosaminidase	major	none	progressive, coarse facies, mental retardation
Sialidosis (mucopolipidosis I)	sialidase	major	minor	progressive, severe mucopolysaccharidosis-like features, mental retardation
Schindler (types I and II)	α -N-acetyl-galactosaminidase	yes	?	<i>type I</i> : infantile onset, neuroaxonal dystrophy, severe psychomotor and mental retardation, cortical blindness, neurodegeneration <i>type II</i> : mild intellectual impairment, angiokeratoma, corpus diffusum
Galactosialidosis	protective protein/cathepsin A	major	minor	coarse facies, skeletal dysplasia, early death
Fucosidosis	α -fucosidase	major	minor	spectrum of severities includes psychomotor retardation, coarse facies, growth retardation
GM1 gangliosidosis	β -galactosidase	minor	major	progressive neurological disease and skeletal dysplasia in severe infantile form
GM2 gangliosidosis	β -hexosaminidase	minor	major	severe form: neurodegeneration with death by 4 years less severe form: slower onset of symptoms and variable symptoms, all relating to various parts of the central nervous system

В этой таблице приведены патологии, вызванные дефектами деградации гликопротеинов и гликолипидов. Здесь представлено название патологии, соответствующий фермент, активность которого нарушена и симптомы патологии. Большинство симптомов связано с нарушением функционирования нервной системы, что не удивительно, учитывая то, что большинство субстратов для перечисленных ферментов экспрессируется на нервных клетках. Для этих болезней характерна смертность в раннем возрасте.

Дефекты деградации гликолипидов: гликозидозы

7

Disease name	Enzyme or protein deficiency	Clinical symptoms
Tay–Sachs	β -hexosaminidase A	<i>severe</i> : neurodegeneration, death by 4 years <i>less severe</i> : slower onset of symptoms, variable symptoms all relating to parts of the nervous system
Sandhoff	β -hexosaminidase A and B	same as Tay–Sachs
GM1 gangliosidosis	β -galactosidase	see Table 41.1
Sialidosis	sialidase	see Table 41.1
Fabry	α -galactosidase	severe pain, angiokeratoma, corneal opacities, death from renal or cerebrovascular disease
Gaucher's	β -glucocereamidase	<i>severe</i> : childhood or infancy onset, hepatosplenomegaly, neurodegeneration <i>mild</i> : child/adult onset, no neurodegenerative course
Krabbe	β -galactoceramidase	early onset with progression to severe mental and motor deterioration
Metachromatic leukodystrophy	arylsulfatase A (cerebroside sulfatase)	infantile, juvenile, and adult forms can include mental regression, peripheral neuropathy, seizures, dementia
Saposin deficiency	saposin precursor	similar to Tay–Sachs and Sandhoff

Здесь показаны примеры гликозидозов, которые связаны с дефектами деградации исключительно гликолипидов. Многие названия патологий ассоциированы с именами первооткрывателей. Единственный способ лечения – постоянное употребление ферментов.

Дефекты деградации гликозаминогликанов: мукополисахаридозы

8

Number	Common name	Enzyme deficiency	Glycosaminoglycan affected	Clinical symptoms
MPS I H	Hurler, Hurler/Scheie, Scheie	α -L-iduronidase	DS, HS	<i>Hurler</i> : corneal clouding, organomegaly, heart disease, mental retardation, death in childhood <i>Hurler/Scheie and Scheie</i> : less severe, individuals survive longer
MPS II	Hunter	iduronate-2-sulfatase	DS, HS	<i>severe</i> : organomegaly, no corneal clouding, mental retardation, death before 15 years <i>less severe</i> : normal intelligence, short stature, survival age 20–60
MPS III A	Sanfilippo A	heparan N-sulfatase	HS	profound mental deterioration, hyperactivity, relatively mild somatic manifestations
MPS III B	Sanfilippo B	α -N-acetylglucosaminidase	HS	similar to III A
MPS III C	Sanfilippo C	acetyl CoA: α -glucosaminide acetyltransferase	HS	similar to III A
MPS III D	Sanfilippo D	N-acetylglucosamine 6-sulfatase	HS	similar to III A
MPS IV A	Morquio A	galactose-6-sulfatase	KS, CS	distinctive skeletal abnormalities, corneal clouding, odontoid hypoplasia, milder forms known to exist
MPS IV B	Morquio B	β -galactosidase	KS	same as IV A
MPS VI	Maroteaux-Lamy	N-acetylgalactosamine 4-sulfatase	DS	corneal clouding, normal intelligence, survival to teens in severe form; milder forms known to exist
MPS VII	Sly	β -glucuronidase	DS, HS, CS	wide spectrum of severity, including hydrops fetalis and neonatal form
	multiple sulfatase deficiency	sulfatase modifying factor converts cysteine→formyl glycine	all sulfated glycans	hypotonia, retarded psychomotor development, quadriplegia

На этом слайде представлены болезни, вызванные дефектами деградации гликозаминогликанов – мукополисахаридозы. Это заболевания различной степени тяжести, которые также лечатся только потреблением фермента.

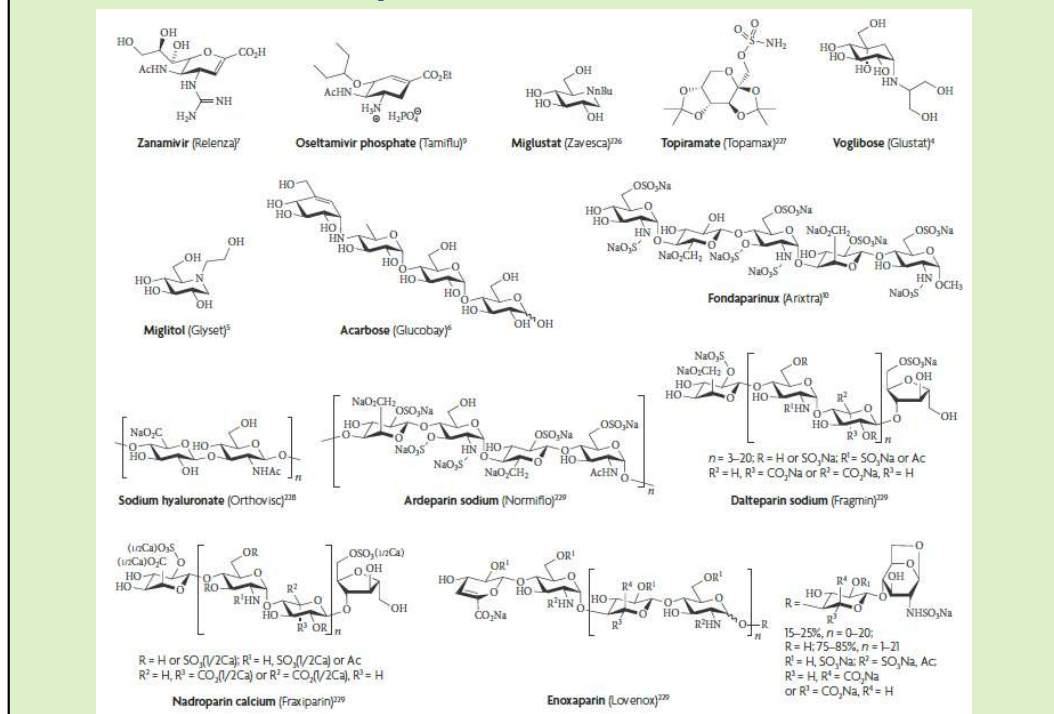
Медицинская гликобиология

**Углеводные лекарства:
антагонисты углевод-белковых взаимодействий**

Рассмотрим один из вариантов углеводных лекарств, когда они выступают в качестве антагонистов углевод-белковых взаимодействий.

Углеводные лекарства

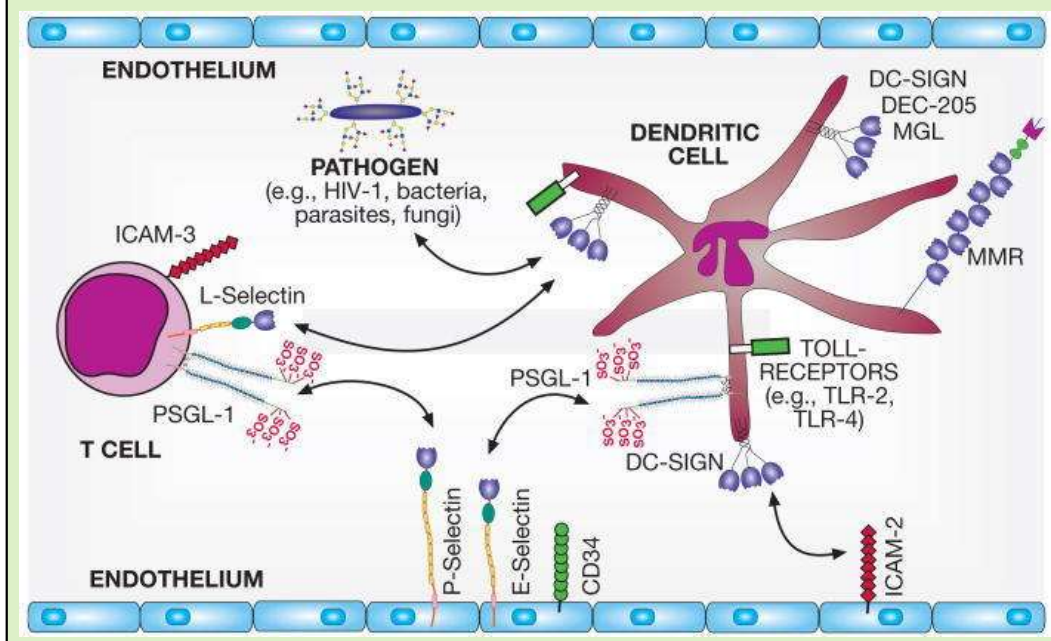
10



При этом углеводное лекарство имитирует природный лиганд и конкурирует с ним за связывание с белком, в результате чего соответствующий процесс, например, сигнальный, терминируется. Здесь приведены структуры таких лекарств, среди которых можно видеть препараты, использующиеся для лечения диабета, гриппа или как антикоагулянты.

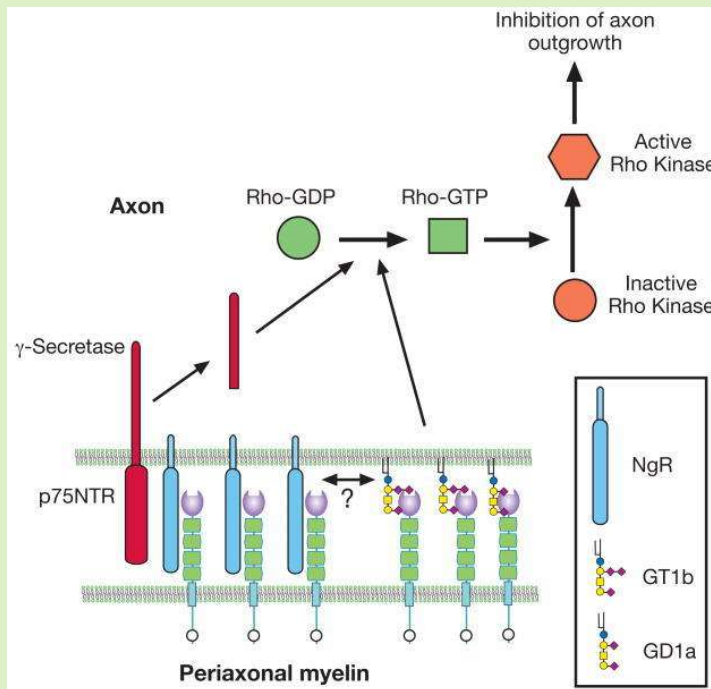
Лектины: система врожденного иммунитета, распознавание патогенов и клеточная адгезия

11



Лектины являются компонентами врожденного иммунитета. Происходит это благодаря тому, что многие иммунные клетки несут на поверхности лектины, которые распознают углеводные структуры многих патогенов, а, распознав, фагоцитируют патоген. Более того, лектины участвуют в адгезии клеток, например, в процессе роллинга лимфоцитов по кровеносным сосудам.

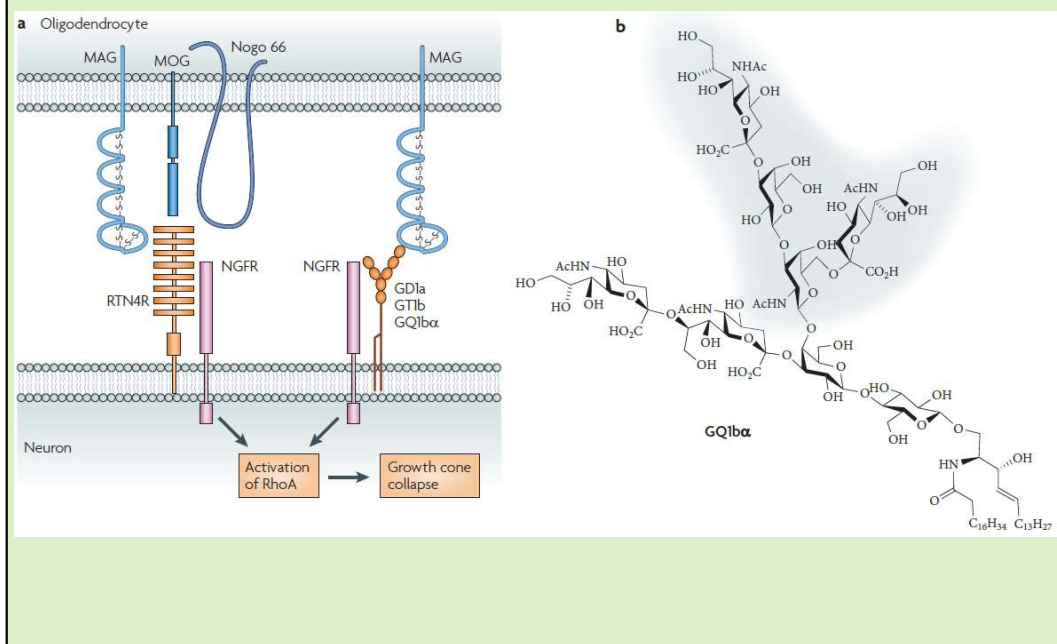
Ингибирование роста аксонов сиглеком-4 (MAG) 12



Известен пример ингибирования роста аксонов на нервных клетках, которое осуществляет лектин (миелин-ассоциированный гликопротеин, сиглек-4), способный распознавать углеводные структуры ганглиозидов на нейронах.

Взаимодействие сиглека-4 (MAG) с GQ1b α

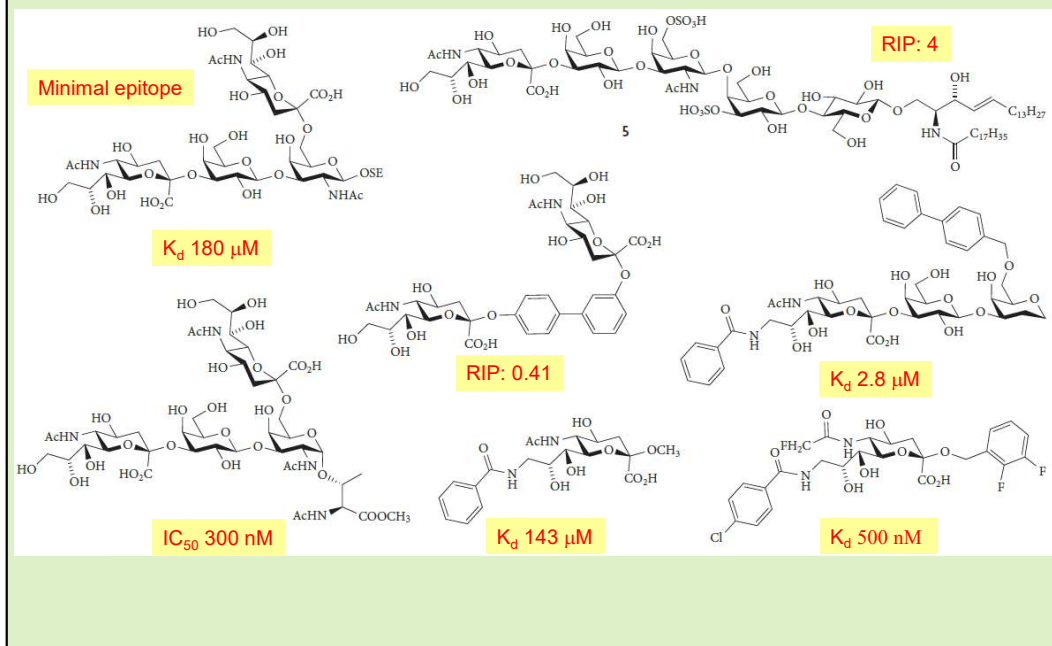
13



На этом слайде представлена схема, демонстрирующая взаимодействие сиглека-4 с аксоном. Поэтому разработка лекарственного препарата, способного ингибировать это взаимодействие, повысит регенерацию аксонов после повреждения и позволит осуществлять передачу нервных импульсов. Это так называемая пластичность нейронов.

На следующих слайдах будут представлены структуры кандидатов таких лекарств, повышающие пластичность нейронов. Все эти структуры содержат много остатков сиаловых кислот. Справа показана структура самого активного соединения с четырьмя такими остатками. Выделенная серым областью (верхние ветви) является минимальным эпитопом. 2-6-связанная сиаловая кислота в этом эпитопе была заменена на остаток серной кислоты, аналогично вместо нижней ветви из двух остатков сиаловой кислоты также введен остаток серной кислоты. См. следующий слайд

Антагонисты взаимодействия сиглека-4 (MAG) с **14** GQ1b α – стимуляторы пластичности нейронов



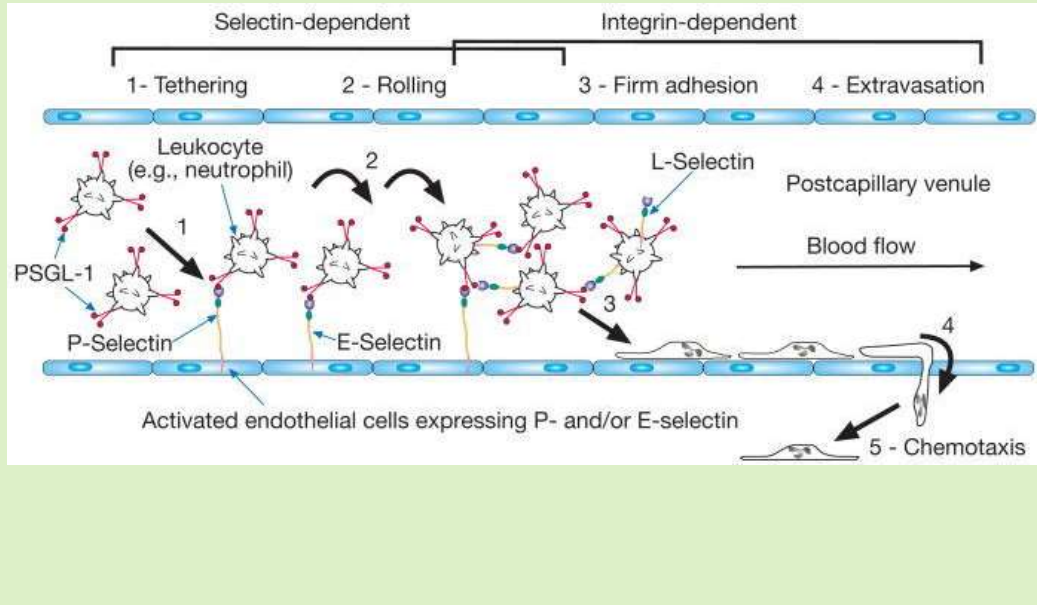
И такая замена дала вполне активное соединение 5.

Есть и другие более простые, чем родоначальный ганглиозид, структуры, которые неплохо работают. Но они все равно достаточно сложны.

При этом структура агликона и аномерная конфигурация моносахарида на восстанавливающем конце очень важны для проявления активности.

Можно «среднюю» часть олигосахарида вырезать, заменив на фрагмент бифенила, которые обеспечит правильное расположение в пространстве двух остатков сиаловых кислот. И полученная структура все равно работает. Можно оставить только одну сиаловую кислоту и менять группы вокруг нее. В результате мы получаем микромолярные ингибиторы. Главное в этом сложном процессе понять, какие именно группы вовлечены во взаимодействие с лектином. Ясно, что в данном случае карбоксильная группа крайне важна. Это пример того, как делается дизайн будущих лекарств.

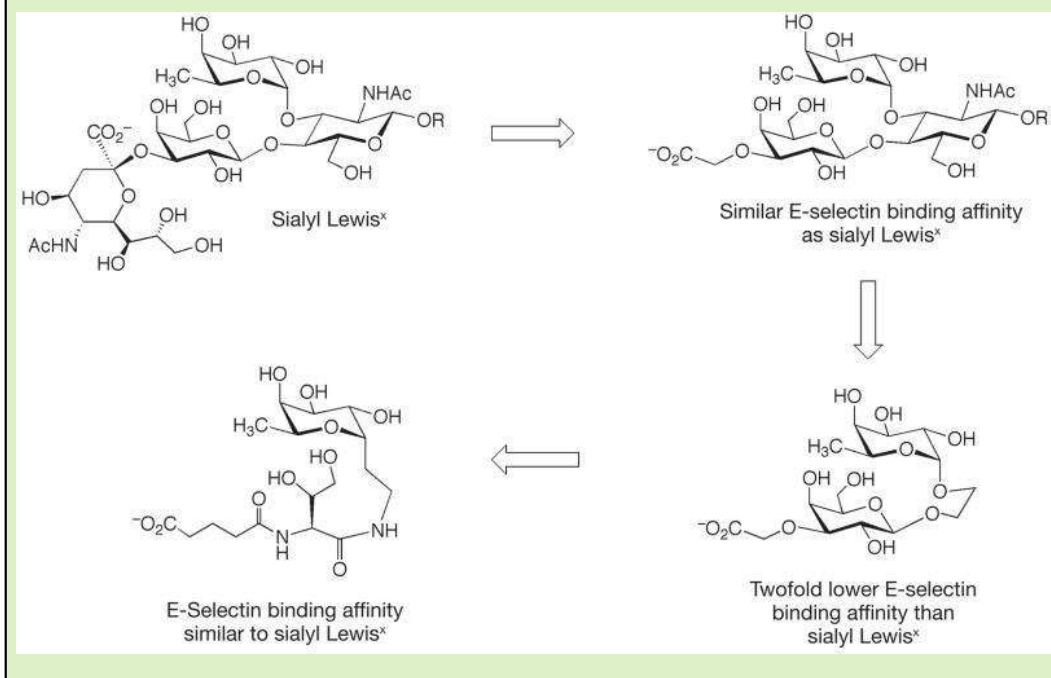
Мобилизация лейкоцитов к сайту воспаления: участие селектинов 15



Лектины (селектины), экспрессируясь на эндотелиальных клетках, участвуют в развитии воспалительного процесса, благодаря их взаимодействию с лигандами на иммунных клетках, что обеспечивает мобилизацию лейкоцитов в сайт воспаления.

Ингибиторы E-селектина – аналоги SiaLe^x

16

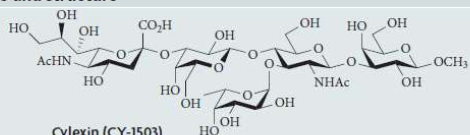
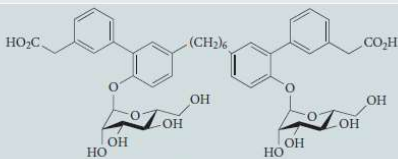
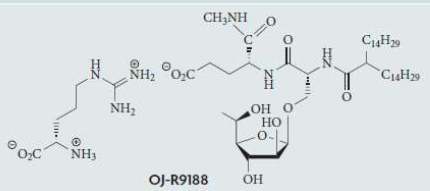


Однако в некоторых случаях для снижения воспалительной реакции необходимо ингибировать это взаимодействие. Для чего синтезируют аналоги природного лиганда E-селектина – сиалил-Lewis X. Самая последняя структура (слева внизу) обладает активностью, сопоставимой с таковой для родоначального природного соединения. Отметим, что в ней уже нет сиаловой кислоты вообще. Осталась только карбоксильная группа.

Антагонисты селектинов

17

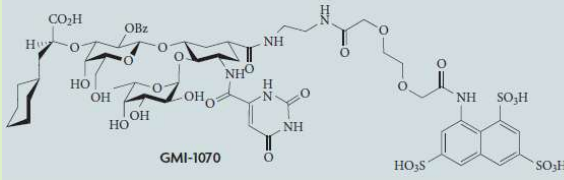
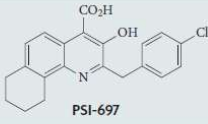
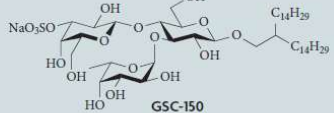
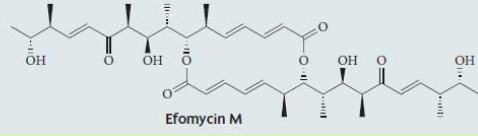
Table 1 | Small-molecule selectin antagonists in preclinical and clinical trials

Name and structure	Specificity	Disease	Institution	Status	Refs
 <p>Cylexin (CY-1503)</p>	E-, P- and L-selectin	Cardio-vascular injury	Cytel	Stopped	179
 <p>Bimosiamose (TBC-1269)</p>	E-, P- and L-selectin	Asthma and psoriasis	Revotar	Phase IIa	180
 <p>OJ-R9188</p>	E-, P- and L-selectin	Allergic dermatitis	Nippon Organon	Preclinical	181

На слайде приведены структуры веществ, которые тестировались в качестве антагонистов селектинов для лечения сердечно-сосудистых расстройств, астмы и псориаза или аллергического дерматита.

Антагонисты селектинов

18

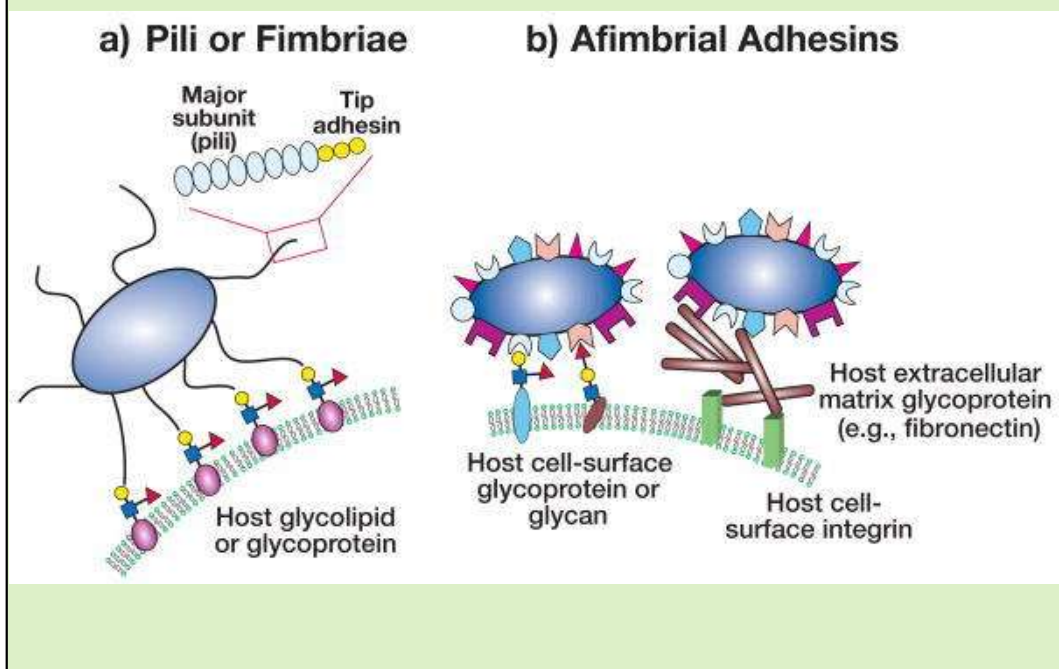
 <p>GMI-1070</p>	E-, P- and L-selectin	Sickle cell crisis	Glyco-Mimetics	Phase I	182
 <p>PSI-697</p>	P-selectin	Athero-thrombotic and venous thrombotic diseases	Wyeth	Phase I	183
 <p>GSC-150</p>	E-, P- and L-selectin	Metastatic cancer	Kanebo	Unknown	184
 <p>Efomycin M</p>	E- and P-selectin	Psoriasis	Bayer	Preclinical	185

Здесь приведены еще примеры антагонистов, некоторые из которых уже имеют не углеводную природу.

Медицинская гликобиология

Бактериальная адгезия
Анти-адгезионная анти-бактериальная терапия

Множество работ направлено на поиск веществ, препятствующих бактериальной адгезии.



Адгезия бактерий может запускаться благодаря тому, что выросты бактерий (фимбриии или пили) на концах имеют адгезины - лектины, которые узнают углеводные структуры гликолипидов или гликопротеинов на поверхности мембраны клеток организма-хозяина. Некоторые бактерии, не имеющие таких выростов могут взаимодействовать напрямую, т.к. несут на поверхности своей клетки лектины, распознающие соответствующие сайты на поверхности клеток-хозяина. Есть варианты, когда посредниками выступают гликопротеины внеклеточного матрикса (например, фибронектин).

Examples of mechanisms of bacterial adherence to host-cell surfaces. (a) Pili or fimbriae are organelles that project from the cell surface. They are made up of a repeating structural subunit and a protein at their tip that mediates recognition of a specific host-cell glycan motif. (b) Afimbrial adhesins are integral bacterial cell wall proteins or glycoproteins that directly engage host-cell receptors to promote colonization.

Углеводы поверхности клеток – сайты присоединения бактериальных патогенов

21

Organism	Target tissue	Carbohydrate	Structure
<i>E. coli</i> Type 1	Urinary	Man α 3Man α 6Man	GP
<i>E. coli</i> P	Urinary	Gal α 4Gal	GL
<i>E. coli</i> S	Neural	NeuAc (α 2-3)Gal β 3GalNAc	GL
<i>E. coli</i> CFA/1	Intestinal	NeuAc (α 2-8)	GP
<i>E. coli</i> F1C	Urinary	GalNAc β 4Gal β	GL
<i>E. coli</i> F17	Urinary	GlcNAc	GP
<i>E. coli</i> K1	Endothelial	GlcNAc β 4GlcNAc	GP
<i>E. coli</i> K99	Intestinal	NeuAc(α 2-3)Gal β 4Glc	GL
<i>C. jejuni</i>	Intestinal	Fuc α 2Gal β GlcNAc	GP
<i>H. pylori</i>	Stomach	NeuAc(α 2-3)Gal β 4GlcNAc	GP
		Fuc α 2Gal β 3(Fuc α 4)Gal	GP
<i>K. pneumoniae</i>	Respiratory	Man	GP
<i>N. gonorrhoea</i>	Genital	Gal β 4Glc(NAc)	GL
<i>N. meningitidis</i>	Respiratory	[NeuAc(α 2-3)] Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc	GL
<i>P. aeruginosa</i>	Respiratory	L-Fuc	GP
	Respiratory	Gal β 3Glc(NAc) β 3Gal β 4Glc	GL
<i>S. typhimurium</i>	Intestinal	Man	GP
<i>S. pneumoniae</i>	Respiratory	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	GL
<i>S. suis</i>	Respiratory	Gal α 4Gal β 4Glc	GL

GP = glycoprotein, GL = glycolipids

На этом слайде перечислены структуры углеводов поверхности клеток – сайты присоединения различных бактериальных патогенов. Он призван проиллюстрировать разнообразие углеводных структур, узнаваемых бактериям.

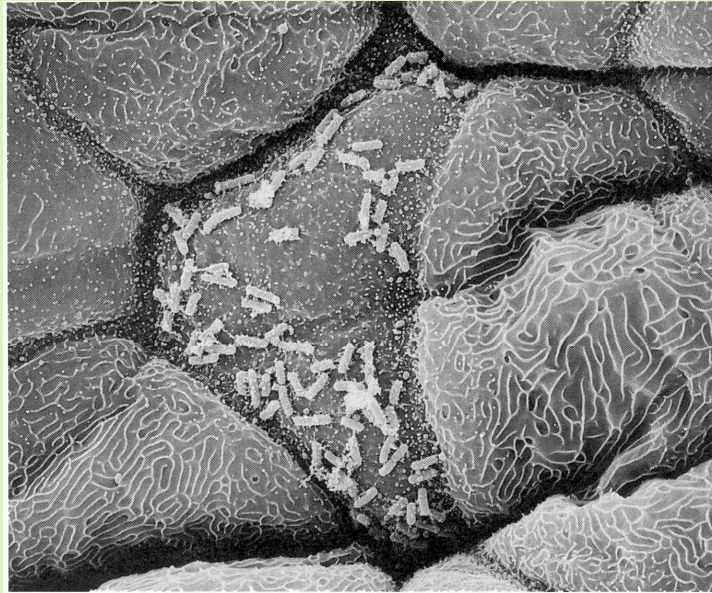
О важности этих процессов углевод-белкового узнавания свидетельствует только один факт.

Было установлено, что многим известные гастрит и язва желудка связаны с инфицированием бактерией *Helicobacter pylori*, живущей в кислом содержимом желудка и в его слизистой оболочке. “За открытие бактерии *Helicobacter pylori* и ее роли при гастрите и язвенной болезни” в 2005 г. была присуждена Нобелевская премия по медицине и физиологии.

Интересен фактически философский вопрос, зачем клетки животных создают на своей поверхности весьма специфичные сайты для присоединения патогенных бактерий. Т.е. создают в мощной системе защиты лазейки для врага. В литературе даже сравнивают этот феномен с предательством.

Селективность адгезии *E. coli*

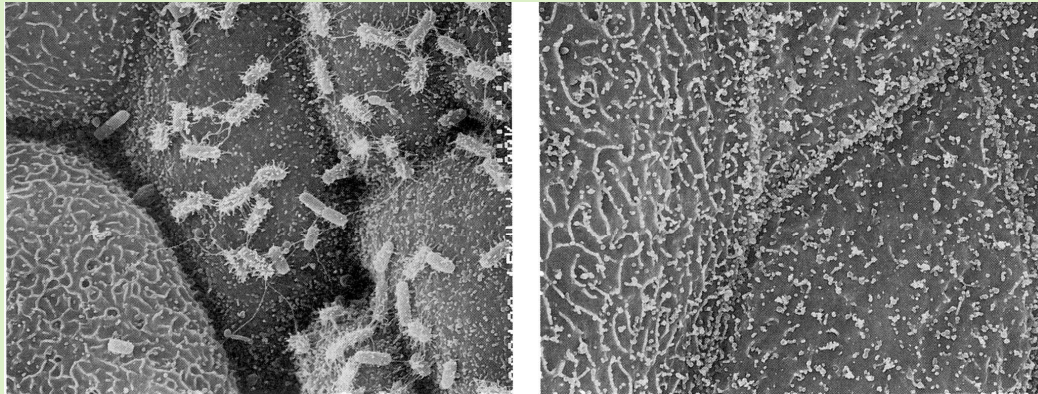
22



BACTERIA ADHERE to tissues selectively. Hairlike protrusions called fimbriae on the bacteria bind exclusively to certain surface carbohydrates. These interactions determine which tissues are susceptible to bacterial invasion. Rod-shaped *Escherichia coli* bacteria are shown here on tissue from the urinary tract.

Эта фотография демонстрирует селективность адгезии кишечной палочки к тканям мочевыводящих путей.

**Селективность бактериальной адгезии (слева) 23
и ингибирование адгезии (справа): *E. coli***



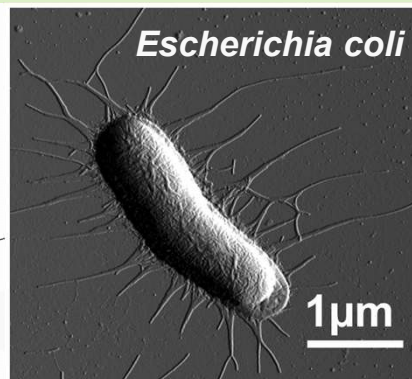
SELECTIVE EFFECTS of carbohydrates on bacteria are illustrated in these photographs. These *E. coli* have a lectin for the P glycolipid. Bacteria incubated in the sugar mannose can still cling to epithelial tissue (*left*). A constituent of the P glycolipid binds to the bacteria's lectin and prevents adhesion (*right*).

Процесс адгезии селективен. Это показывает фотография слева, на которой кишечная палочка, экспрессирующая на Р-фимбриях адгезин РаpG, распознающий на клетках хозяина гликолипид, имеющий остаток галабиозы. А если добавить к этой системе сам гликолипид, то адгезия к тканям прекращается, т.к. бактерии связываются с гликолипидом, а не с поверхностными тканевыми структурами.

Узнавание углеводов клетки-хозяина лектином бактерии – первый этап адгезии

24

P-Фимбрии – C: галабиоза
Фимбрии типа 1 – FimH: манноза



7. *Comprehensive Glycoscience. From Chemistry to System Biology*, 2007, Ch. 3.28.3.1, p. 636 (2346).
22. *Glycoscience and Microbial Adhesion*. K. Lindhorst, S. Oscarson (Eds.), 2009, 186 pp.
61. A. Bernardi, et al. Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4709.

К настоящему времени накопилось достаточно много весьма убедительных данных в пользу того, что всякая бактериальная инфекция начинается со связывания бактерии с поверхностными углевод-содержащими молекулами клеток хозяина.

Распознавание углеводов поверхности клетки-хозяина лектином бактерии является первым этапом бактериальной адгезии и последующей инвазии.

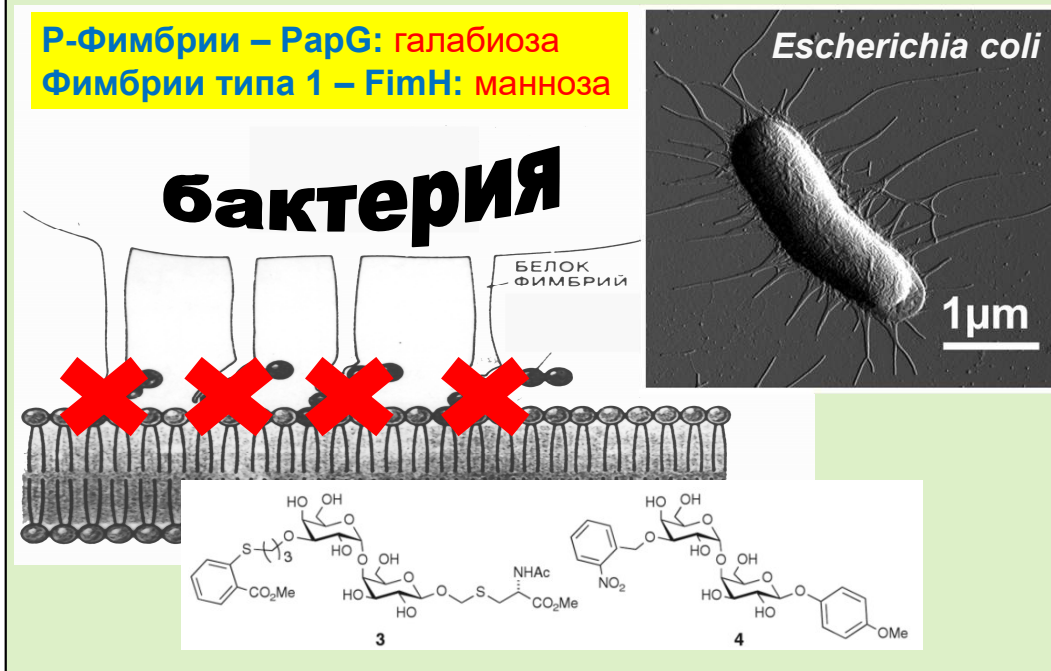
На концах фимбрий (другое название – пили) бактерий расположены адгезины – белки, специфично связывающиеся с определенными углевод-содержащими структурами на поверхности животной клетки. Так, например, адгезины фимбрий типа 1 уропатогенных штаммов кишечной палочки способны узнавать гликопротеины, содержащие маннозу, а адгезины P-фимбрий – гликолипиды глобо-серии, содержащие дисахарид галабиозу. При этом штаммы бактерии, вырабатывающие адгезин PapG, вызывают заболевания почек (пиелонефрит), в то время как другие штаммы бактерий, вырабатывающие адгезин FimH, вызывают воспаления нижних отделов мочевых путей.

У тех редко встречающихся людей, в крови которых нет фактора P, эпителиальные клетки мочевых путей не связывают бактерии кишечной палочки, несущие P-фимбрии. Такие индивиды значительно меньше подвержены инфекциям этой бактерии по сравнению с другими людьми. Однако экспериментально установлено, что если их эпителиальные

клетки покрыть синтетическим гликолипидом, содержащим галабиозу , то эти клетки приобретают способность связываться с *E. coli*.

Ингибирование связывания лектина бактерии с 25 углеводами клетки – анти-адгезионная терапия

P-Фимбрии – PapG: галабиоза
Фимбрии типа 1 – FimH: манноза

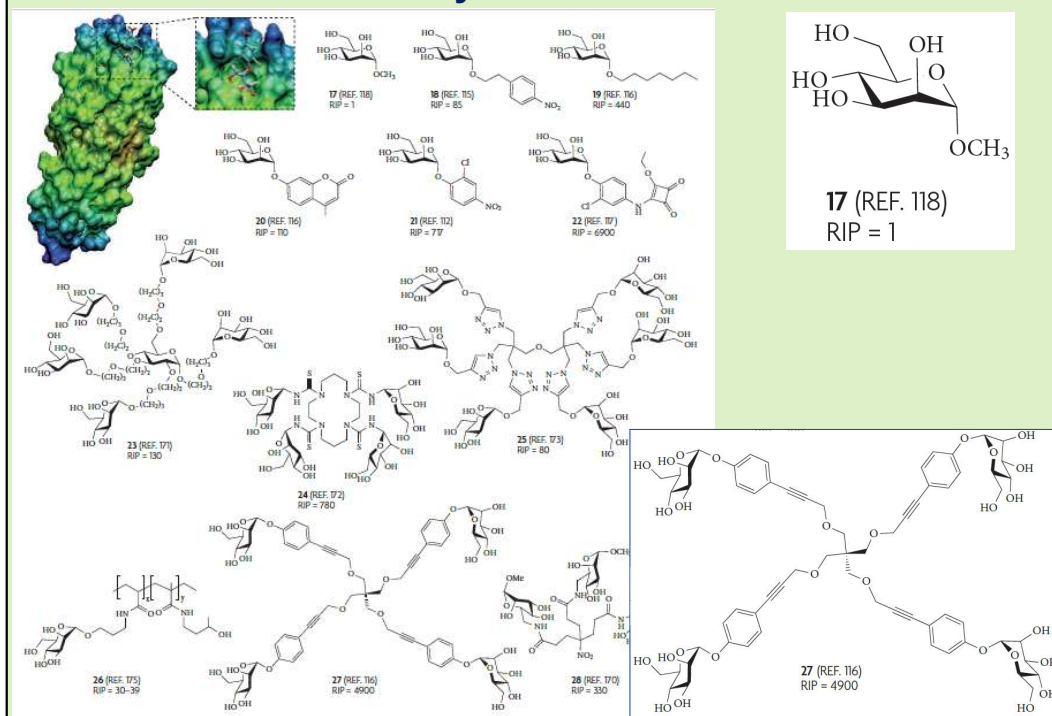


Адгезию можно ингибировать, вводя лиганды для адгезинов P-фимбрий. Эти структуры представлены на сайте

Изучение бактериальной адгезии ведется уже многие годы и является одним из самых разработанных направлений исследований в гликобиологии. Действительно, если научиться ингибировать связывания лектина бактерии с углеводами клетки, то это может явиться основой антиадгезионной терапии. В некоторых случаях это действительно удается. Здесь показаны структуры ингибиторов адгезина PapG, которые были успешно использованы для терапии пиелонефрита. Бактерии «предпочитают» связываться с этими веществами, а не с остатками галабиозы на эпителиальных клетках почек.

Антагонисты FimH: мультивалентность

26



Здесь представлены лиганды для адгезинов FimH фимбрий типа 1, содержащие остатки маннозы.

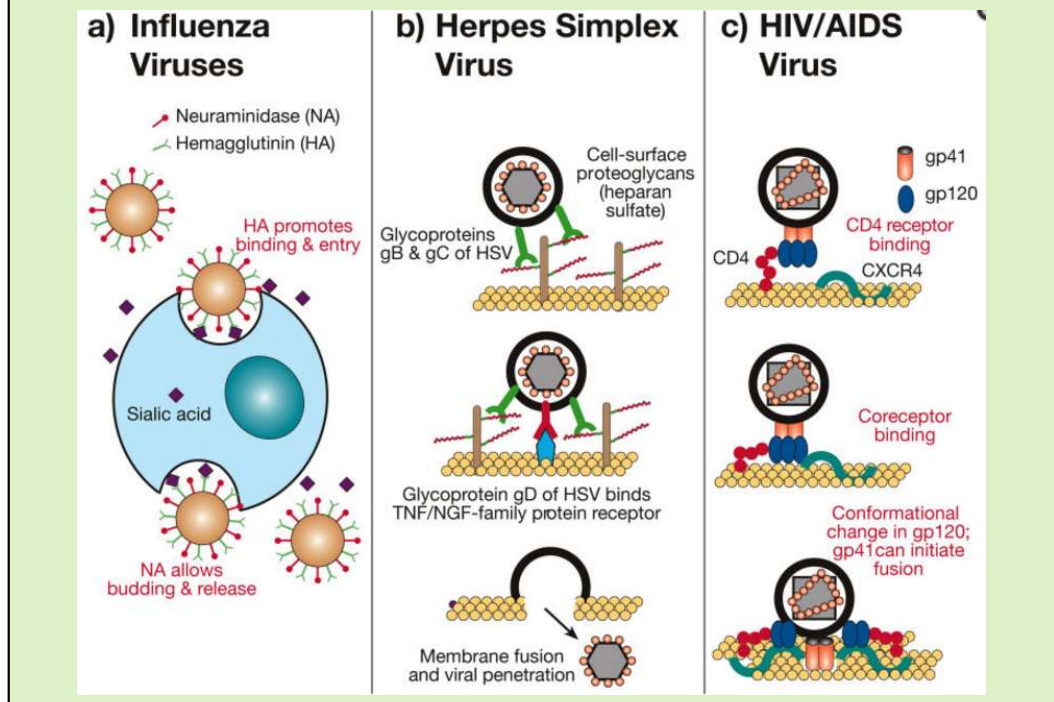
Здесь показаны примеры мультивалентных ингибиторов. Самым эффективным оказалось соединение с четырьмя остатками маннозы, показанное снизу справа, которое почти в 5 тысяч раз эффективнее моносахарида (альфа-метил-маннозида).

Медицинская гликобиология

Анти-адгезионная терапия
(вирусы)

Аналогичную идею можно использовать для разработки анти-адгезионной терапии, препятствующей первичной адгезии вирусов.

Механизм проникновения вируса в клетку хозяина ²⁸



Известно много вариантов механизма проникновения вируса в клетку хозяина. Здесь представлены механизмы с участием углеводных структур.

Вирус гриппа сначала присоединится к клетке хозяина (и затем проникает в нее) с помощью лектина гемагглютинина, который распознает олигосахариды, содержащие остатки сиаловых кислот. В результате репликации вируса внутри клетки хозяина, новые вирусы должны разорвать связь гемагглютинина с гликаном на поверхности клетки хозяина. Для этого вирус использует другой белок – нейраминидазу, которая отщепляет остатки сиаловых кислот гликанов хозяина.

Другой механизм использует вирус герпеса, который имеет на своей поверхности ряд гликопротеинов. Первый этап адгезирования к клетке хозяина осуществляют гликопротеины gB и gC, которые прикрепляются к поверхностному гепарансульфату клеток-хозяина. Второй этап, характеризующийся образованием высокоафинной связи, осуществляет белок gD, который связывается с рецепторами семейства ФНО.

Вирус иммунодефицита человека использует сложный механизм адгезии и проникновения в клетку хозяина. Первичное связывание осуществляется при последовательном присоединении гликопротеина gp120 и рецепторами на лимфоцитах: сначала CD4, затем CCR4. После чего происходит конформационный переход в гликопротеине gp120, результате этого фактор gp41 приближается к мембране лимфоцитов и

начинается процесс слияния с мембраной. Так вирус проникает в клетку.

Некоторые данные по рецепторам вирусов

29

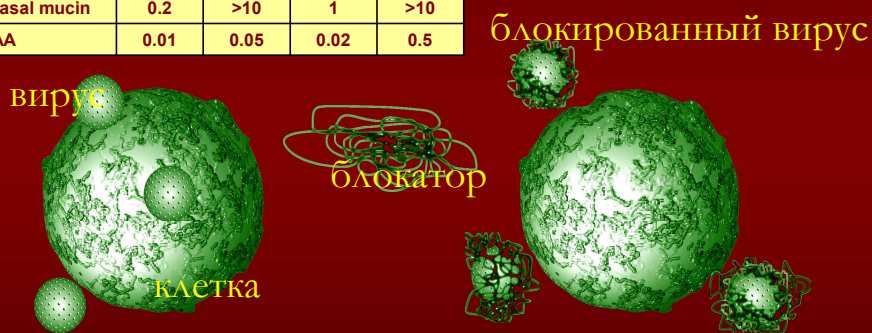
Вирус	Угледод-рецептор
REOVIRUSES (gastroenterites, respiratory diseases, conjunctivite)	Sialo-oligosaccharides (sialo-OS)
ORTOMIXOVIRUSES (influenza): A, B C	Sialo-OS Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β - 9-O-Ac-Neu5Ac α -
PARAMIXOVIRUSES: SEV, NDV (respiratory diseases)	Sialo-OS
ADENOVIRUSES (gastroenterites, respiratory diseases, conjunctivite)	Sialo-OS
CORONAVIRUSES (gastroenterites, respiratory diseases)	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -
PAPOVAVIRUSES (oncology)	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -
PHYLOVIRUSES (hemorrhagic fever)	GAGs
HERPESVIRUSES: HSV, EBV, CMV (oncology)	GAGs
CALICIVIRUSES: NV (gastroenterites)	H (type 1)
RETROVIRUSES: HIV-1, 2 (AIDS)	GalCer

Очень многие вирусы для присоединения к поверхности клетки хозяина используют поверхностные углеводные структуры, которые часто содержат остатки сиаловых кислот. Кроме того, это могут быть гликозаминогликаны или другие структуры, приведенные на слайде.

Принцип анти-адгезионной терапии гриппа

30

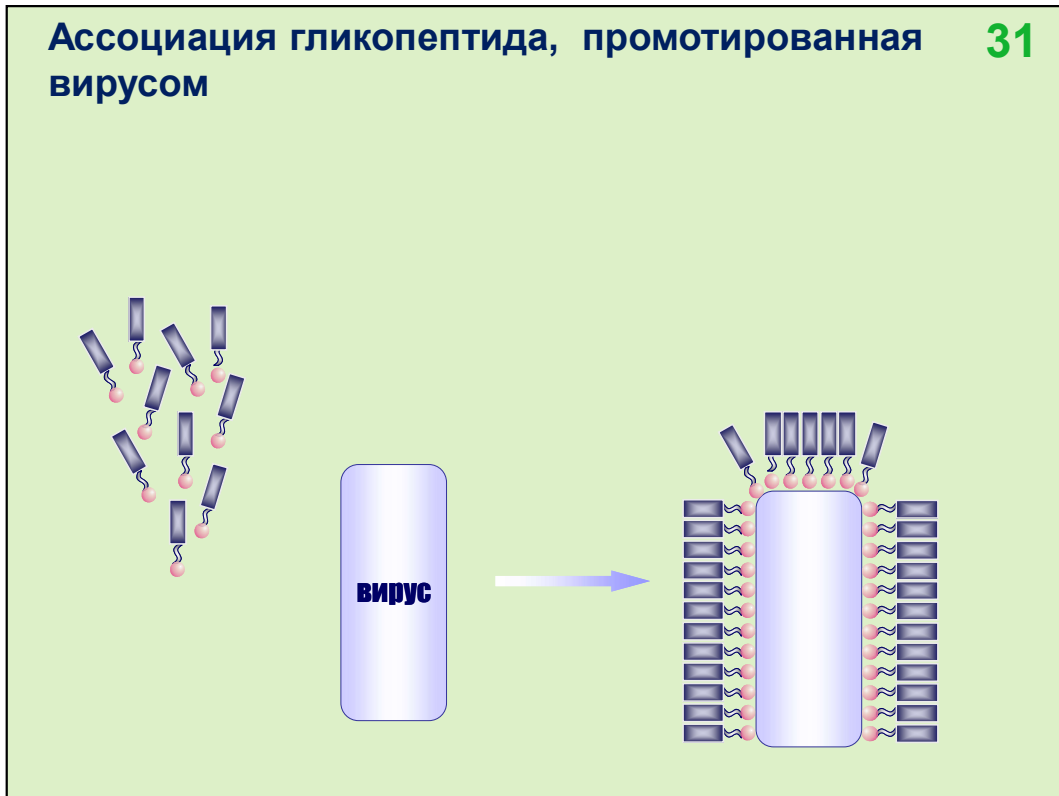
Inhibitors	Viruses			
	A/NIB/23/89M (H1N1)		A/NIB/26/90M (H3N2)	
	K_{diss}	$IC_{90\%}$	K_{diss}	$IC_{90\%}$
Human tracheal mucin	0.1	>10	0.5	>10
Human nasal mucin	0.2	>10	1	>10
6'SLN-PAA	0.01	0.05	0.02	0.5



Замедление процесса инфицирования вирусом достигается за счет ингибирования адгезии вируса к клетке хозяина благодаря конкурирующему действию блокатора. В качестве таких блокаторов могут быть природные муциновые гликопротеины, содержащие много сиалилированных структур, которые распознаются гемагглютинином вируса гриппа. А также синтетические полимеры, например, сиалиллактозамин, присоединенный к полиакриламиду.

Ассоциация гликопептида, промотированная вирусом

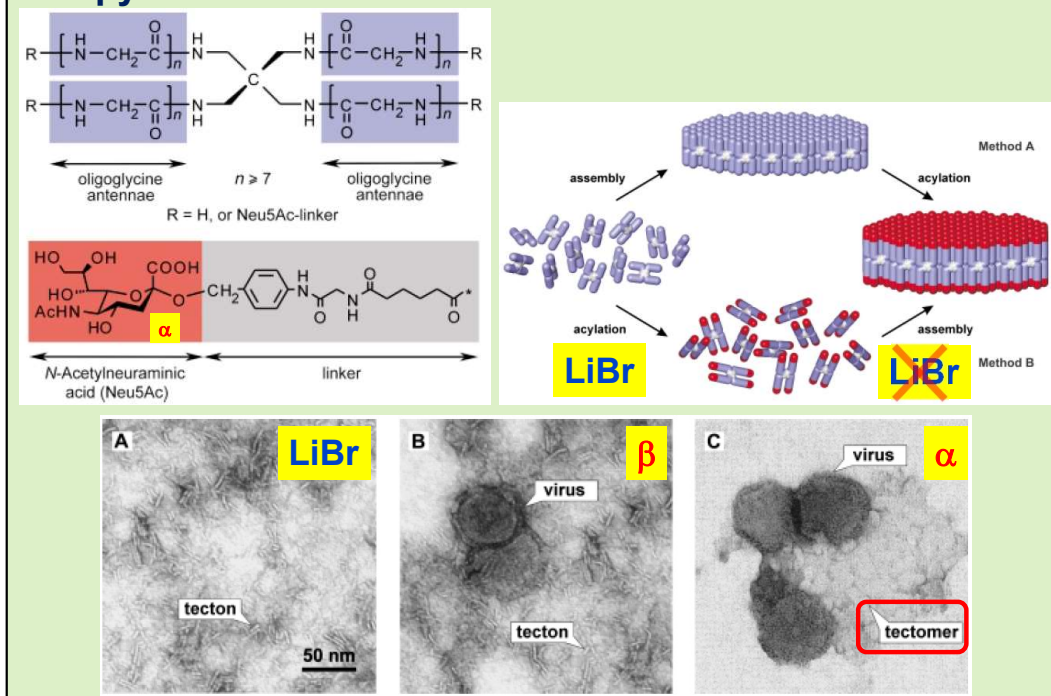
31



Можно использовать гликопептидные фрагменты, которые будут ассоциировать в процессе связывания с вирусом.

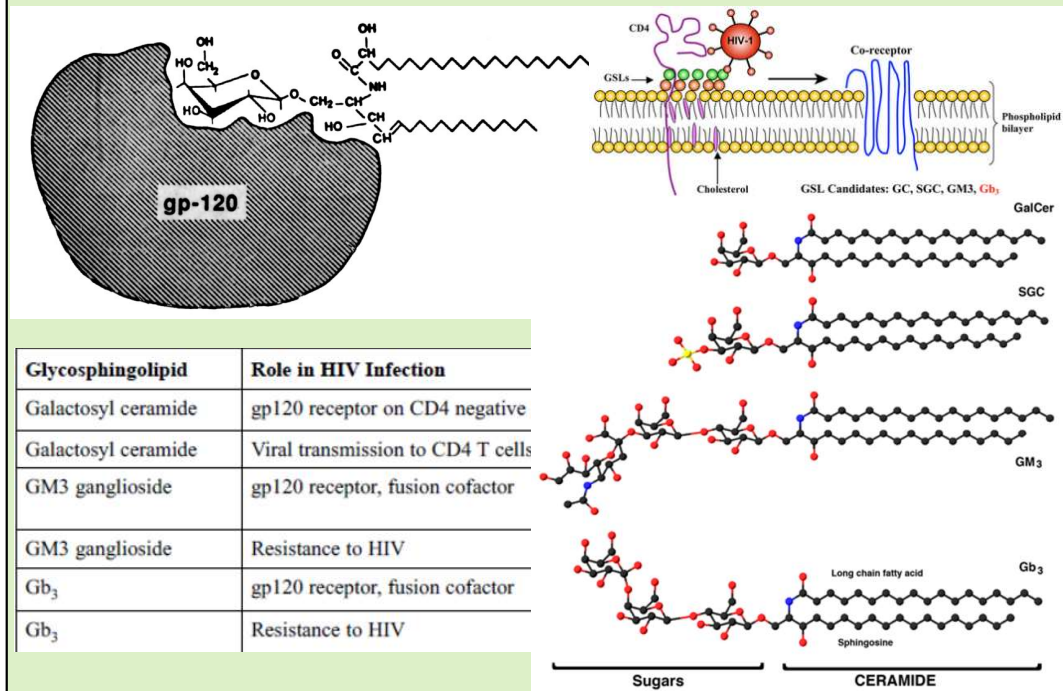
Ассоциация гликопептида, промотированная вирусом

32



Для этого был синтезирован тетравалентный гликопептид, содержащий олигоглициновые антенны, к которым присоединили остатки сиаловых кислот, которые распознаются гемагглютинином вируса гриппа. Реакцию образования олигоглициновых фрагментов (тектонов) проводят в присутствии LiBr, чтобы препятствовать самоассоциации тектонов, происходящей за счет образования водородных связей. А после присоединения остатков сиаловых кислот LiBr удаляют, и получают ассоциированный сиалилированный слой. Для связывания подобной конструкции с вирусом необходимо, чтобы присутствовали остатки сиаловых кислот в [альфа]-конфигурации. Бета-изомер не активен.

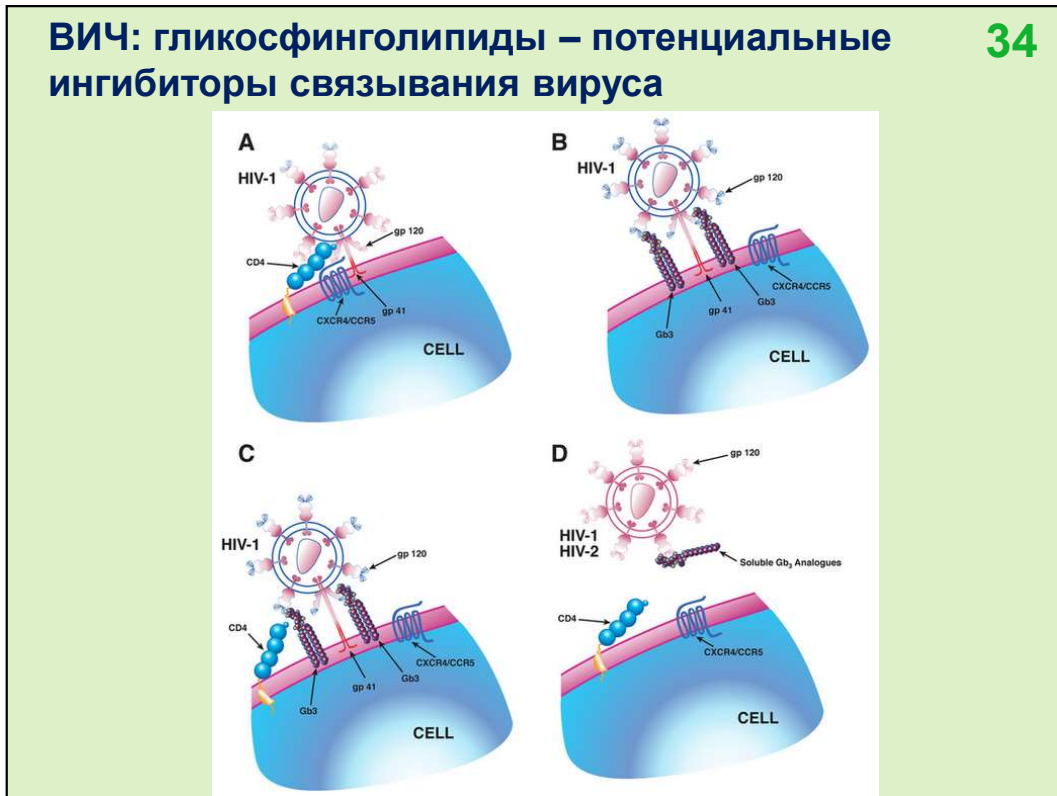
Вирус иммунодефицита человека: β -GalCer и др. 33



Гликопротеин gp120 вируса иммунодефицита человека для адгезии к клеткам хозяина использует много различных механизмов. Оказывается, он связывается с гликолипидами (галактозилцерамид и др.), т.е. выступает как лектин.

ВИЧ: гликофинголипиды – потенциальные ингибиторы связывания вируса

34



Напомню, что вирус иммунодефицита человека использует сложный механизм адгезии и проникновения в клетку хозяина. Первичное связывание осуществляется при последовательном присоединении гликопротеина gp120 и рецепторами на лимфоцитах: сначала CD4, затем CCR4. После чего происходит конформационный переход в гликопротеине gp120, результате этого фактор gp41 приближается к мембране лимфоцитов и начинается процесс слияния с мембраной. Так вирус проникает в клетку.

Оказалось, что gp120 вируса иммунодефицита человека связывается с гликофинголипидами и в отсутствие CD4 на клетках хозяина (это было показано экспериментально). Это усиливает связь вируса с клеткой. Поэтому препятствовать связыванию вируса с клеткой могут растворимые аналоги таких гликофинголипидов.

Медицинская гликобиология

Онкология

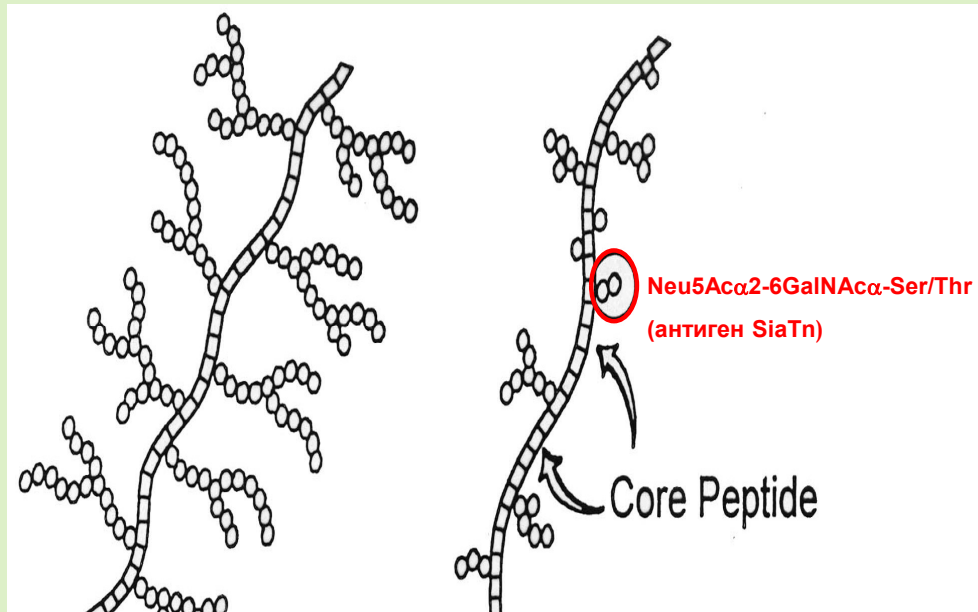
Перейдем к онкологии

Опухоль-ассоциированный антиген SiaTn

36

Нормальный муцин

Муцин онкобольных



Прежде всего необходимо вспомнить, что в норме муцины сильно гликозилированы, они содержат длинные и разветвленные олигосахаридные фрагменты, присоединенные к кору муцина. Тогда как на муцинах онкобольных были обнаружены только короткие углеводные фрагменты, присоединенные к полипептидному кору.

- ▶ Почему «ассоциированные», а не «специфические»?
 - ▶ «Опухолевые маркеры» – соединения, которые продуцируются опухолевыми клетками или организмом в ответ на развитие опухоли.
 - ▶ Опухоль-специфические антигены экспрессируются только клетками опухоли.
 - ▶ Опухоль-ассоциированные антигены слабо экспрессированы в нормальных тканях и характеризуются более высокой степенью экспрессии в опухолевых клетках по сравнению с нормальными (или «не в то время, не в том месте»).
- ▶ Зачем клетки опухоли меняют профиль гликозилирования?
 - ▶ Измененное гликозилирование помогает уходить от иммунного ответа. Некоторые механизмы этого ухода:
 - ▶ перманентная экспрессия новых антигенов (или «хорошо забытых»).
 - ▶ увеличение секреции гликопротеинов и гликосфинголипидов: функции «ложная цель» и иммуносупрессия.
 - ▶ Адаптация к новому соседству.
 - ▶ Новые цепи способствуют метастазированию (лиганды галектинов)
 - ▶ Новые цепи участвуют в ангиогенезе (SiaLe^x).
- ▶ Измененное гликозилирование – причина или следствие?

Примеры углеводных опухоль-ассоциированных антигенов

38

Обозначение	Структура
SiaTn	Neu5Ac α 2-6GalNAc α -Ser/Thr
Tn	GalNAc α -Ser/Thr
TF (T)	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr
GD3	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal
GD2	GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3)Gal
GM2	GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Gal
Globo-H	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α
FucGM1	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Gal
Le ^y	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc
Dimeric Le ^x	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{matrix} 3 \\ \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{matrix}$ </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{matrix} 3 \\ \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{matrix}$ </div> </div>
Polysialic acid	(Neu5Ac α 2-8) _n
SiaLe ^a	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3)GlcNAc

На слайде приведены примеры опухоль-ассоциированных антигенов, присутствие которых указывает на онкотрансформацию.

Профили экспрессии углеводных опухоль-ассоциированных антигенов в различных опухолях/тканях/органах

39

Table 3 | Expression profiles of tumour-associated carbohydrate antigens on malignant tissues

Tumour	Tumour-associated carbohydrate antigens*														
	sLe ^x	Le ^x	sLe ^a	Le ^a	sTn	Tn	TF	Le ^y	Globo H	PSA	GD2	GD3	Fucosyl GM1	GM2	
B-cell lymphoma	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✓	ND	ND	✓	
Breast	ND	ND	✓	ND	✓	✓	✓	✓	✓	ND	ND	ND	ND	✓	
Colon	ND	ND	✓	ND	✓	ND	✓	✓	ND	ND	ND	ND	ND	✓	
Lung	✓	ND	ND	ND	✓	ND	ND	✓	✓	ND	ND	ND	ND	✓	
Melanoma	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✓	✓	ND	✓	
Neuroblastoma	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✓	✓	✓	ND	✓	
Ovary	ND	ND	ND	ND	✓	ND	✓	✓	✓	ND	ND	ND	ND	✓	
Prostate	ND	ND	ND	ND	✓	✓	✓	✓	ND	ND	ND	ND	ND	✓	
Sarcoma	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✓	✓	ND	✓	
Small cell lung	ND	ND	✓	ND	ND	ND	ND	ND	✓	✓	ND	ND	✓	✓	
Stomach	ND	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND	ND	ND	ND	✓	

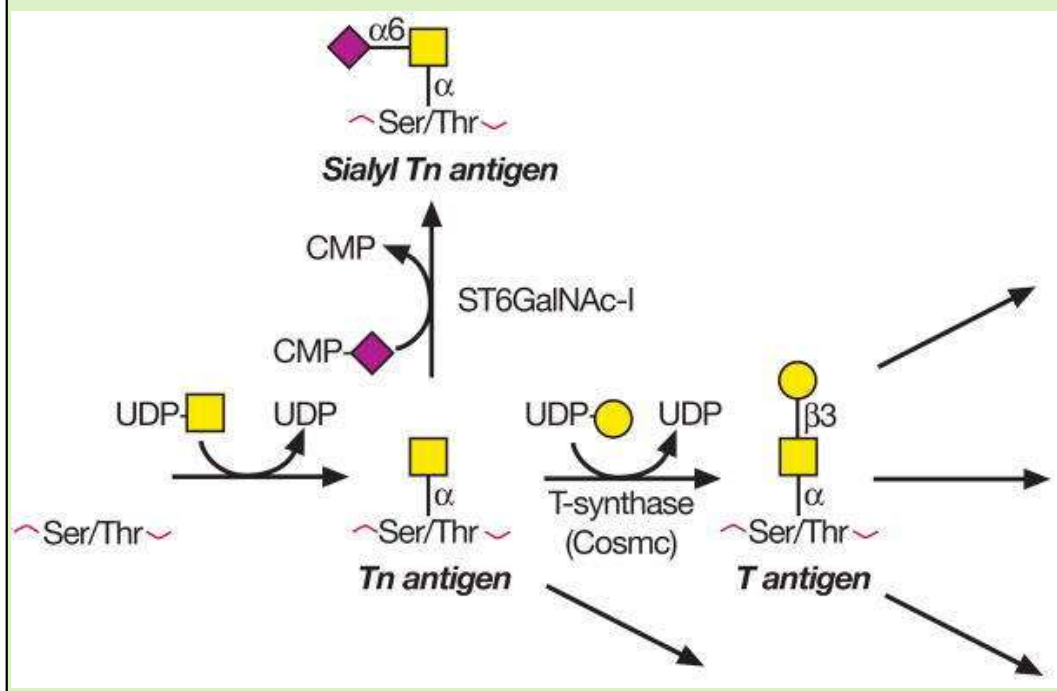
Globo H, globohexaosylceramide; Le, Lewis; ND, not detected at given threshold; PSA, polysialic acid; s, sialyl; TF, Thomsen-Friedenreich; Tn, 2-6- α -N-acetyl-galactosaminyl. *Antigens present on at least 50% of cancer cells in at least 60% of biopsy specimens based on REFS 191, 192.

Изучение профилей экспрессии углеводных опухоль-ассоциированных антигенов в опухолях различных тк

аней показывает, что их распределение различается. Большой набор антигенов обнаружен в опухолях желудка. Однако для большинства тканей антигены экспрессируются достаточно селективно. Лишь некоторые из них характерны для всех тканей (например, ганглиозид GM2 экспрессируется во всех тканях).

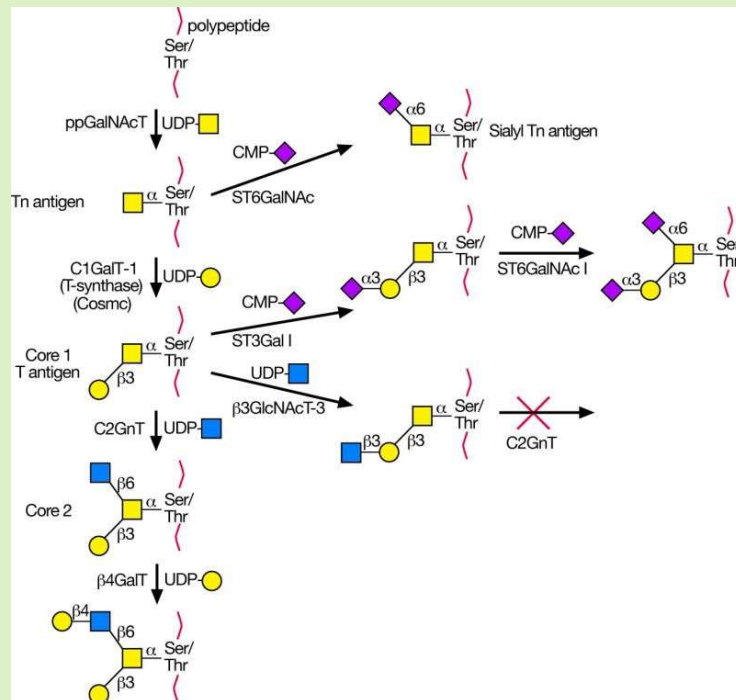
Незавершенное гликозилирование О-цепей: антигены Tn, SiaTn («тупиковая» структура) и T

40



Как вы помните, синтез О-цепей гликопротеинов включает несколько этапов, первый из которых – это перенос [альфа]-N-ацетилгалактозамина на остаток серина или треонина. В опухолевых клетках этот процесс останавливается на этой стадии, т.к. активность/экспрессия соответствующих ферментов снижена. Такие производные называются Tn-антиген. Если один остаток галактозы присоединяется к остатку N-ацетилгалактозамина в Tn-антигене, то образуется T-антиген. При этом для опухолевых клеток характерно наличие сиалил-Tn-антигенов, когда остаток N-ацетилгалактозамина сиалилируется. Это тупиковые структуры.

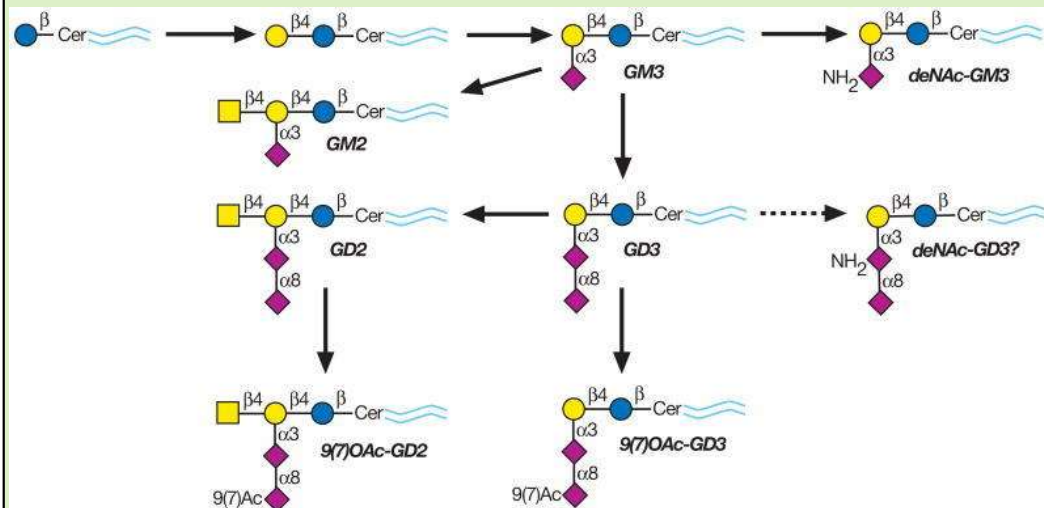
Биосинтез некоторых О-гликанов с корами 1 и 2 41



Эти коры не могут дальше удлиняться, т.к. большинство из них не являются субстратами гликозилтрансфераз (как это видно на этой схеме).

Гиперэкспрессия ганглиозидов

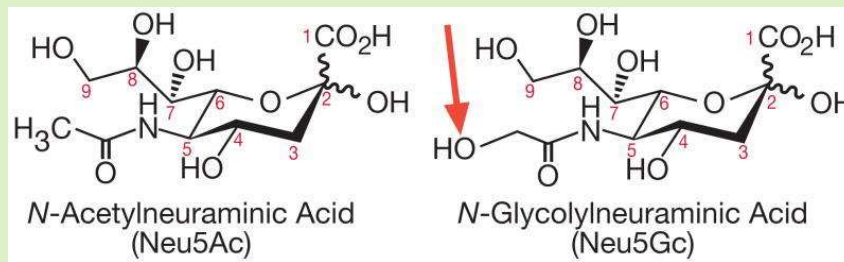
42



Некоторые гликоконъюгаты более эффективно экспрессируются при онкотрансформации. Прежде всего это ганглиозиды (GM2 и др. представленные на слайде), которые в норме присутствуют только на нервных клетках.

Гиперэкспрессия нетипичной для человека N-гликолилнейраминовой кислоты (Neu5Gc)

43

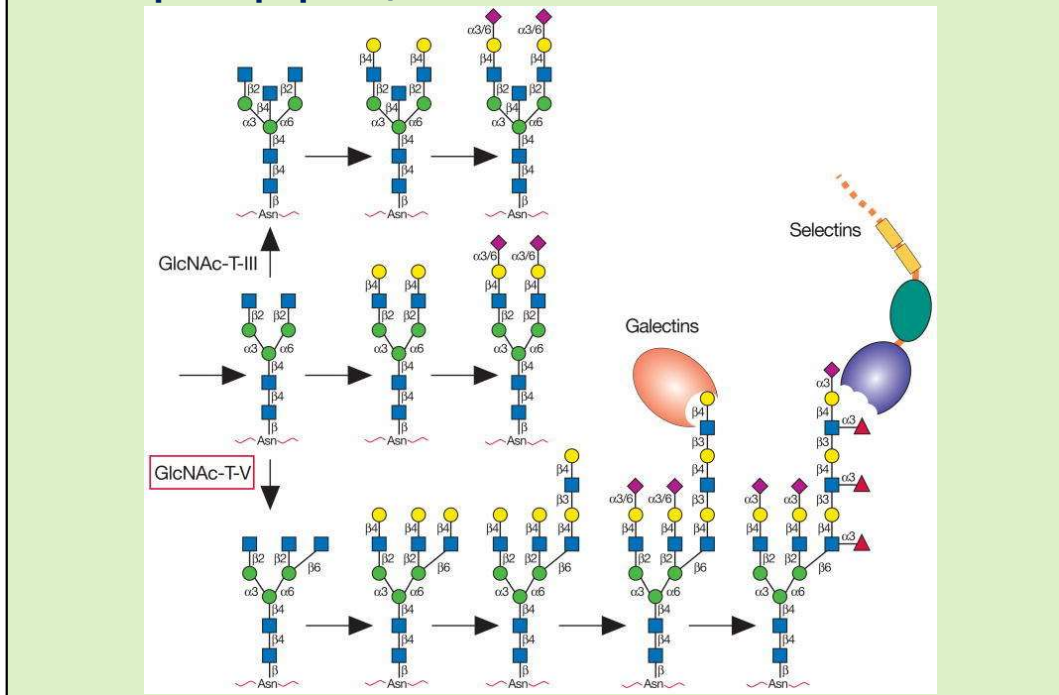


- ▶ Путь биосинтеза Neu5Gc у человека не известен:
(мутация фермента гидроксилазы при переходе от приматов к человеку)
- ▶ Источник – животная пища (→ вегетарианство?)
- ▶ Выработка антител против Neu5Gc
- ▶ Слабый иммунный ответ выгоден для опухоли:
 - ▶ Усиливает хроническое воспаление
 - ▶ Усиливает ангиогенез

В случае онкотрансформации наблюдается экспрессия нетипичной для человека N-гликолилнейраминовой кислоты. В норме у человека нет фермента, необходимого для биосинтеза этой кислоты, поэтому считается, что основной источник этой кислоты – это животная пища. Против N-гликолилнейраминовой кислоты в организме синтезируются антитела. Хроническое воспаление и усиленный ангиогенез стимулируют развитие онкопроцесса.

Увеличение размеров N-гликанов при онкотрансформации: GNT-III и GNT-V

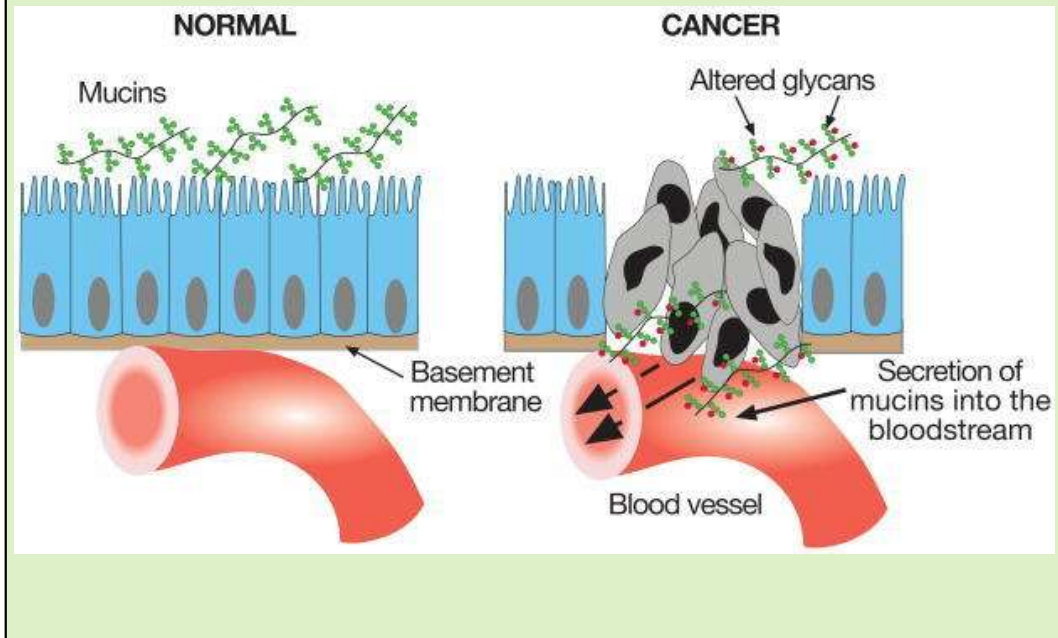
44



При онкотрансформации наблюдается повышение активности гликозилтрансфераз, приводящее к образованию ДЛИННЫХ цепей N-гликанов. Эти цепи активно распознаются лектинами (галектинами и селектинами). Обратите внимание, при онкотрансформации N-цепи удлиняются, а O-цепи укорачиваются.

Муцины при онкотрансформации: растворимые и мембранные

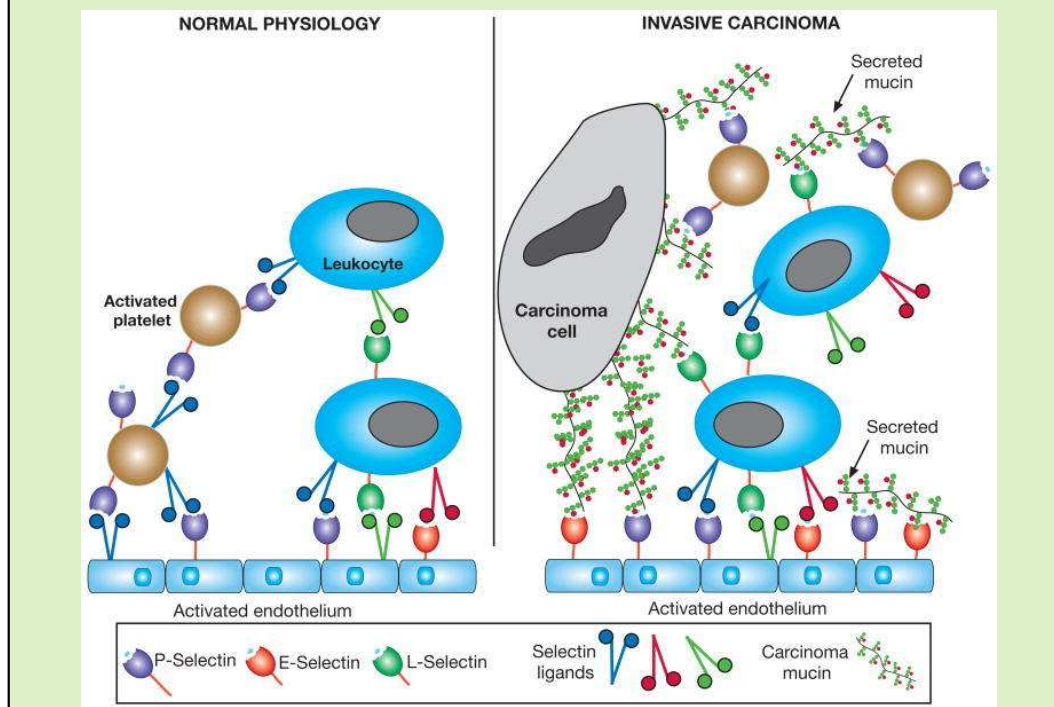
45



Структура гликанов в муцинах изменяется при онкотрансформации, что приводит к тому, что эти гликаны и клетки, их несущие, проникают в кровоток, что способствует образованию метастаз.

Возможные взаимодействия с селектинами

46



В норме процесс узнавания селектинами углеводных компонентов гликопротеинов, экспрессируемых на иммунных клетках, способствует мобилизации лейкоцитов к очагу воспаления. Однако на опухолевых клетках тоже присутствуют те же самые углеводные структуры, что приводит к адгезии этих клеток к стенкам кровеносных сосудов с последующим проникновением в ткани и метастазированию.

Возможные пути использования углеводов для лечения рака

47

Disease pathway	Therapeutic opportunity	Examples of carbohydrate-based therapies
Biosynthesis of unnatural carbohydrates on the tumor surface	Raise antibodies to the tumor-associated carbohydrate antigens to develop a vaccination strategy	Carbohydrate antigens on protein carrier for potential treatment of prostate, colon and breast cancer; theratope (sialyl-Tn antigen conjugate vaccine) for metastatic colorectal and breast cancer
Biosynthesis of unnatural carbohydrates on the tumor surface	Use antibodies generated from the tumor-associated carbohydrate antigens to deliver agents to cancer cells	Ligand-targeted liposomal therapeutics
Biosynthesis of unnatural carbohydrates on the tumor surface	Inhibit the carbohydrate processing enzymes	Naturally occurring aza and imino sugars, as well as synthetic derivatives—inhibition of metastatic tumors and tumor growth, as well as pulmonary and colon cancers
Biosynthesis of unnatural carbohydrates on the tumor surface	Inhibit the interactions of the tumor-associated carbohydrates with the lectin receptors, to minimize metastasis	Multivalent sialyl-Le ^x derivatives, as potential antimetastatic agents

В таблице представлены возможные пути использования углеводов для лечения рака. Все они основаны на том, что на поверхности опухолевых клеток экспрессируются углеводы. Против них можно выработать антитела, которые могут использоваться для разработки вакцин или целенаправленной доставки терапевтических препаратов к опухоли. Можно ингибировать активность ферментов, трансформирующих эти гликаны, а также снизить взаимодействие гликанов с селектинами, снижая тем самым метастазирование.



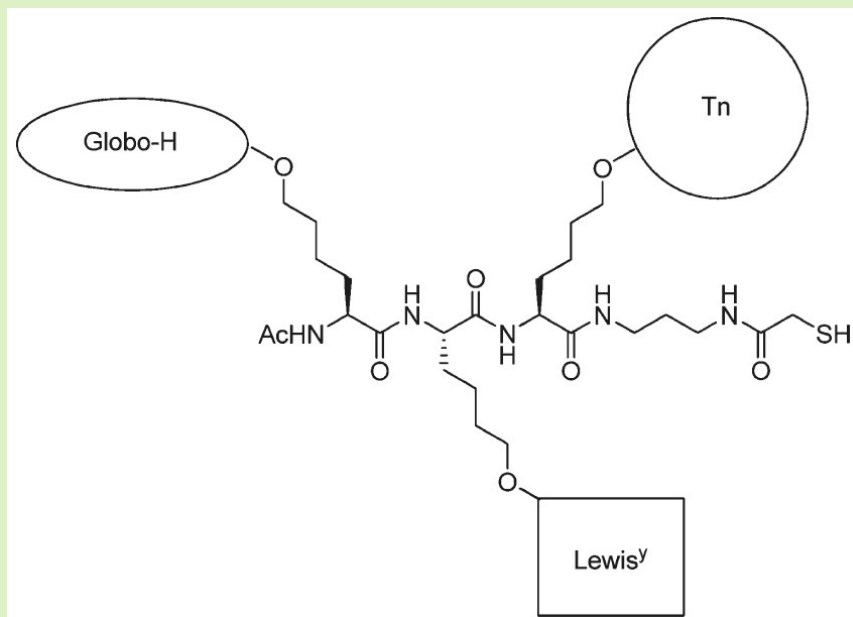
- ▶ Выявление подходящего антигена
- ▶ Дизайн иммуногена и синтез вакцины
- ▶ Иммунизация: антительный и Т-клеточный ответ

Этапы разработки онковакцин включают:

(1) выявление подходящего антигена, (2) дизайн иммуногена, который наряду с антигеном будет содержать белок-носитель, и синтез вакцины, (3) иммунизацию, включающую для которой часто применяют адъювант. Иммунизация призвана вызвать генерацию антительного и Т-клеточного ответа.

Поливалентный прототип онковакцины

49



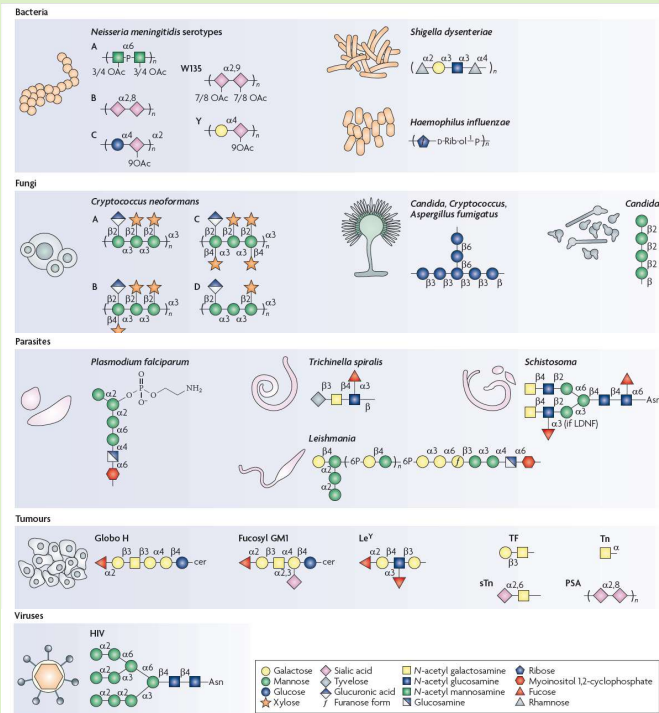
Здесь представлен прототип онковакцины, содержащей набор онкоантигенов Globo-H, Tn и LeY, присоединенных к пептиду.

Медицинская гликобиология

Углеводные вакцины

Эти же принципы используются для создания углеводных вакцин, направленных не только на борьбу с раком.

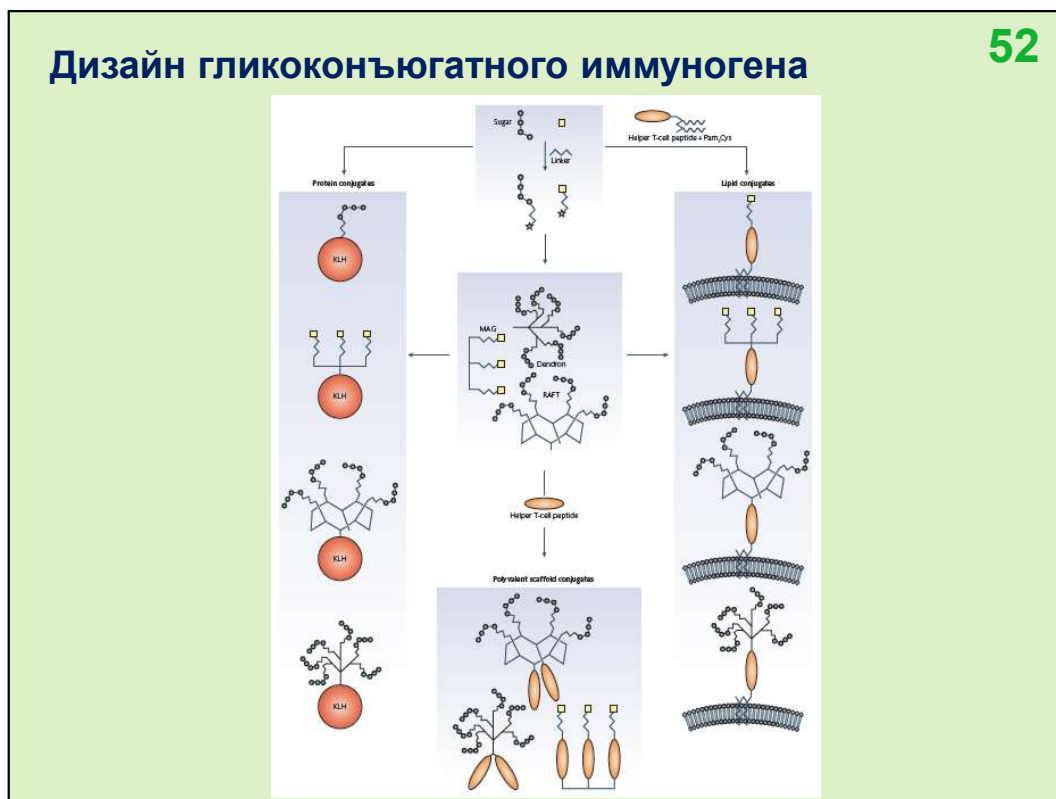
На пути к углеводным вакцинам: антигены



Антигены могут быть разными. Здесь перечислены бактериальные, грибковые антигены, антигены паразитов, а также опухолевые и вирусные.

Дизайн гликоконъюгатного иммуногена

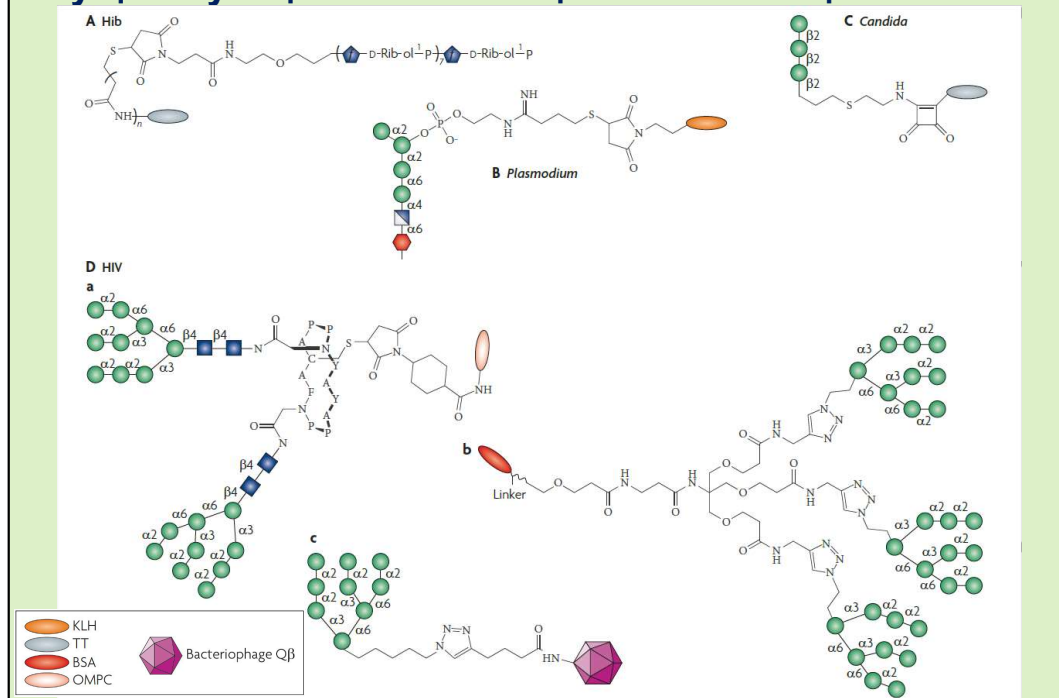
52



Дизайн гликоконъюгатного иммуногена начинается с присоединения антигена к белку-носителю. Иногда антиген конъюгируется непосредственно с адъювантным белком, в других случаях может синтезироваться конструктор, содержащий хелперные (поли)пептиды или липидные компоненты, способствующие выработке Т-зависимого иммунного ответа.

Синтетические углеводные иммуногены – существующие или потенциальные вакцины

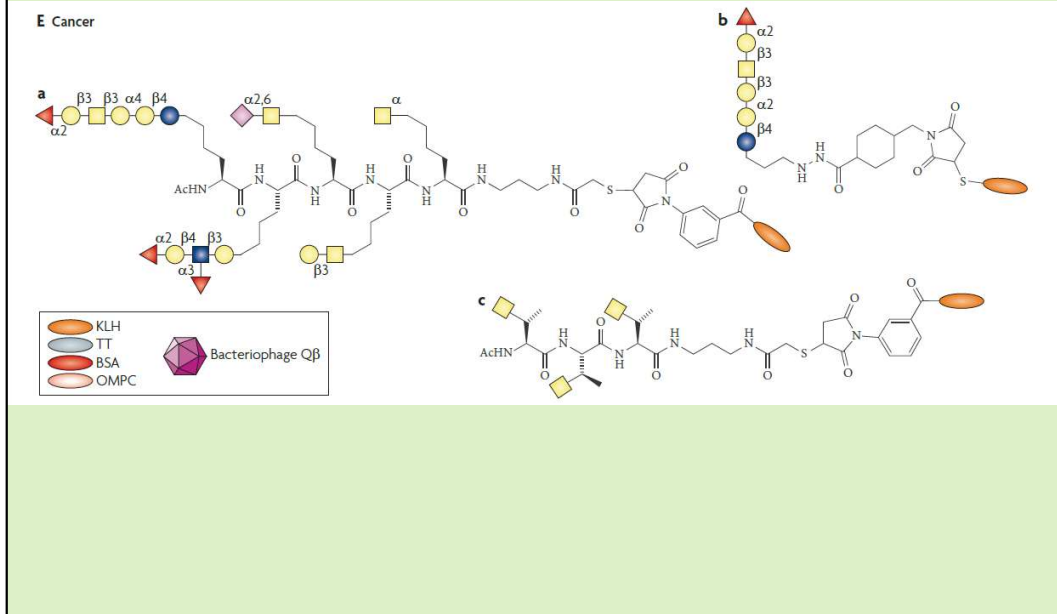
53



Здесь представлены структуры существующих или потенциальных вакцин, где в качестве белков носителей можно увидеть хелперные пептиды и даже бактериофаги.

Синтетические углеводные иммуногены – существующие или потенциальные вакцины

54

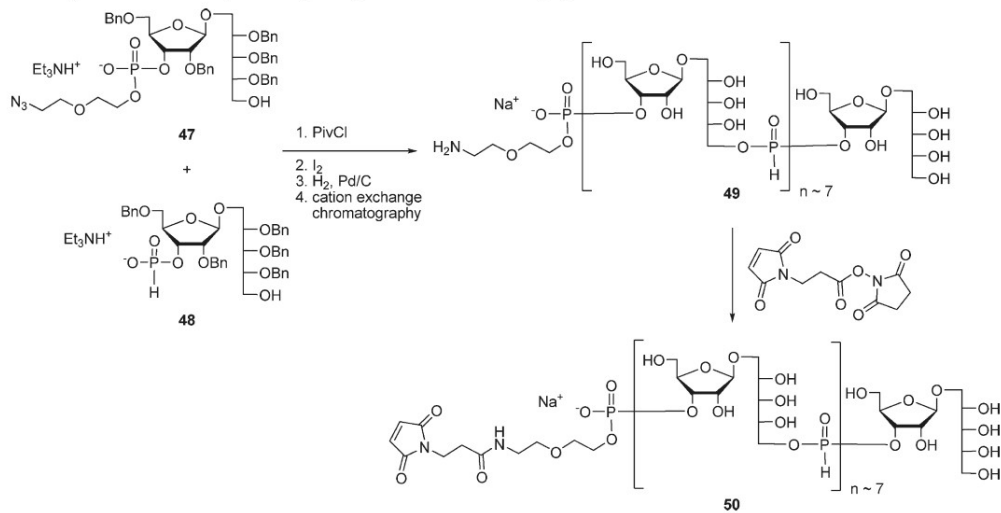


Это пример противораковых вакцин, которые могут иметь сразу пять различных антигенов (пентавалентная вакцина) или один антиген, или включать повторяющиеся звенья одного антигена. Иммунизация такими вакцинами вызывает выработку антител против раковых клеток.

Синтез углеводного гаптена для первой синтетической Нib-вакцины (Куба, 2003)

55

Scheme 8. Synthesis of Hib Capsular Repeating Unit 50 Used for Conjugation to Human Serum Albumin or Tetanus Toxoid



Здесь показан синтез первого синтетического углеводного антигена для Нib-вакцины, проведенный на Кубе в конце XX века.

Лицензированные углеводные вакцины (США)

56

Table 1 | Licensed carbohydrate-based vaccines

Indication	Vaccine	Manufacturer (Trade name)
<i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib)	Glycoconjugate, polysaccharide with tetanus toxoid (TT)	Sanofi Pasteur (ActHIB); GlaxoSmithKline Biologicals (Hiberix)
	Diphtheria toxoid (DT), TT and acellular pertussis adsorbed, inactivated poliovirus and Hib-TT conjugate vaccine	Sanofi Pasteur (Pentacel)
	Hib conjugate (meningococcal protein conjugate)	Merck & Co (PedvaxHIB)
	Hib conjugate (meningococcal protein conjugate) and hepatitis B (recombinant) vaccine	Merck & Co (Comvax)
<i>Neisseria meningitidis</i> A, C, Y and W-135	Glycoconjugate, meningococcal polysaccharide with DT	Sanofi Pasteur (Menactra)
	Meningococcal polysaccharide	Sanofi Pasteur (Menomune-A/C/Y/W-135)
<i>Salmonella typhi</i>	Vi capsular polysaccharide	Sanofi Pasteur (TYPHIM Vi)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F	Pneumococcal polysaccharide 7-valent-CRM197 conjugate	Wyeth Pharmaceuticals (Prevnar)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F and 33F	Pneumococcal polysaccharide, 23-valent	Merck & Co (Pneumovax 23)

В таблице приведены примеры существующих на сегодня углеводных вакцин, состоящих из полисахаридных иммуногенов, выделенных из природных объектов и затем конъюгированных с белками-носителями.

Table 2 | **Examples of carbohydrate-based vaccines in development**

Indication	Vaccine	Phase of development
Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	O-specific polysaccharide–protein conjugate	Phase I ¹⁸²
Group A <i>Streptococcus</i> spp.	Glycoconjugate of Group A polysaccharide with TT	Preclinical ¹⁸³
Group B <i>Streptococcus</i> spp.	Glycoconjugates of type Ia, Ib, II, III and V polysaccharides linked to carrier proteins	Phase II ¹⁸⁴
<i>Haemophilus influenzae</i> (non-typeable)	Subunit-detoxified lipooligosaccharide conjugate	Preclinical ¹⁸⁵
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Octavalent glycoconjugate of O-polysaccharide with toxin A	Phase III ¹⁸⁶
<i>Salmonella typhi</i>	rEPA–Vi conjugate vaccine	Phase III ^{33,187}
<i>Shigella dysenteriae</i>	O-specific polysaccharide–protein conjugate	Preclinical ⁴²
<i>Shigella flexneri</i>	O-specific polysaccharide–protein conjugate	Phase II ¹⁸⁸
<i>Shigella sonnei</i>	O-specific polysaccharide–protein conjugate	Phase III ¹⁸⁹
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Glycoconjugates of synthetic 6B polysaccharide motifs	Preclinical ⁴³
<i>Vibrio cholerae</i>	Lipopolysaccharide–protein conjugate	Phase I ¹⁹⁰
<i>Aspergillus fumigatus</i>	β-Glucan–CRM197 conjugate	Preclinical ^{65,66}
<i>Candida albicans</i>	Cell surface oligomannosyl epitope (various conjugates)	Preclinical ^{63,64}
	β-glucan–CRM197 conjugate	Preclinical ^{65,66}

Это примеры вакцин, которые сейчас находятся на стадии разработок. Разрабатываются вакцины против большого количества бактериальных и грибковых клинически важных возбудителей.

Углеводные вакцины в разработке

58

<i>Cryptococcus neoformans</i>	Glycoconjugate of capsular polysaccharide with TT	Phase I ⁵⁰
	β -glucan-CRM197 conjugate	Preclinical ^{65,66}
<i>Leishmania</i> spp.	Lipophosphoglycan	Preclinical ⁹⁷
	Lipophosphoglycan conjugates	Preclinical ¹⁰³
<i>Plasmodium falciparum</i>	Glycosylphosphatidylinositol-KLH conjugate	Preclinical ⁹³
HIV-1	Man $\alpha(1\rightarrow2)$ Man oligomannosyl epitope (various conjugates, engineered yeast strains and modified glycoproteins)	Preclinical ^{17, 113-118,165}
Breast cancer	Unimolecular hexavalent conjugates (Globo H-GM2-Lewis ^x -sTn-TF-Tn-R)	Preclinical ¹⁴⁹
	sTn(c)-KLH plus QS-21 as adjuvant	Phase I ¹³⁷
Epithelial cancer	Globo H-GM2-Lewis ^x -MUC1-32(aa)-sTn(c)-TF(c)-Tn(c)-KLH conjugate vaccine plus QS-21 as adjuvant	Phase I ¹⁴⁷
Melanoma	GM3NPhAc-KLH	Preclinical ¹⁵²
Prostate cancer	Unimolecular hexavalent conjugates (Globo H-GM2-Lewis ^x -sTn-TF-Tn-R)	Preclinical ¹⁴⁹
	TF(c)-KLH plus QS-21 as adjuvant	Phase I ¹³⁸
	Tn(c)-KLH and Tn(c)-palmitic acid	Phase I ¹³⁹
	Globo H-GM2-Lewis ^x -MUC1-32(aa)-TF(c)-Tn(c)-KLH conjugate vaccine plus QS-21 as adjuvant	Phase II ¹⁴⁶

Это продолжение этой таблицы, которая демонстрирует разнообразие таких разработок.

Медицинская гликобиология

Анти-гликановые «естественные» антитела

В организме обнаружены «естественные» анти-гликановые антитела

Анти-гликановые «естественные» антитела человека

60

- ▶ Есть всегда, независимо от внешнего иммуногена
- ▶ Репертуар в норме у всех людей сходен, стабилен
- ▶ Низкоаффинные, изотип IgM
- ▶ Надзорная роль за:
 - ▶ чужим
 - ▶ абберантным своим
- ▶ Репертуар и уровень меняется при патологиях

Для этих антител характерно следующее:

- Они присутствуют в организме всегда, независимо от того, был ли контакт с иммуногеном или нет.
- Репертуар в норме у всех людей сходен, стабилен. Он в большей степени зависит от возраста, нежели от индивида.
- Эти антитела низкоаффинные, имеют изотип IgM.
- Их функция заключается в надзоре за чужими и абберантным своими антигенами.
- Репертуар и уровень этих антител меняется при патологиях.

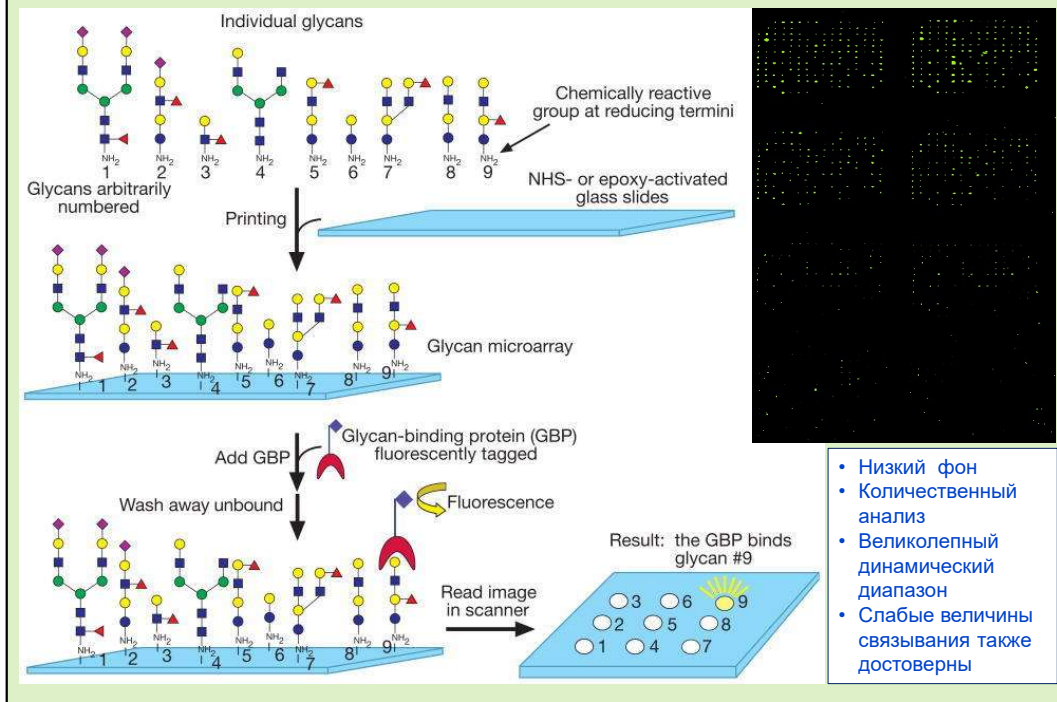
Система врожденного иммунитета остается изученной значительно меньше, чем адаптивного, это справедливо и для гуморального звена врожденного иммунитета, то есть естественных антител. Продукцию естественных антител осуществляет популяция долгоживущих В-1 лимфоцитов, которая составляет 20-35% от общего числа В-клеток; В-1 клетки созревают значительно раньше, чем В-2 клетки, и не исчезают до конца жизни. Иммуноглобулины, направленные против гликанов, составляют значительную (а может быть и преобладающую) часть

естественных антител человека. Наличие их у практически всех здоровых людей и высокое содержание в периферической крови свидетельствует о биологической значимости, в то же время остаются невыясненными их конкретные мишени, механизм действия и генезис; непонятно, являются ли они (некоторые из них?) ауто-антителами. Понимание механизмов функционирования В-1 звена необходимо для построения общей картины действия иммунной системы; фундаментальные исследования в этой области несомненно приведут к разработке принципиально новых методов терапии и диагностики. Основной задачей данного проекта является изучение нескольких наиболее представленных в крови человека анти-гликановых антител, выяснение молекулярной природы их мишеней, их биологической роли, а также структурно-функциональное изучение собственного гликозилирования Ig и участия собственных гликанов в антиген-связывающей и эффекторных функциях естественных антител. Дополнительной задачей является обоснованное объяснение наблюдаемого отсутствия аутоиммунной реакции данной группы антител с клетками и тканями, имеющими в своем составе комплементарные гликаны. В результате выполнения данного исследования, будет экспериментально проверена наша гипотеза, согласно которой антигликановые естественные антитела направлены к внутренним (маскированным на клеточной поверхности) сайтам углеводных цепей и (или) их паттернов, и поэтому элиминируют раковые клетки, не взаимодействуя с нормальными. Изучаемые естественные антитела были впервые выделены и охарактеризованы в исследовательской группе данного проекта.

Будет проверяться гипотеза о надзорной функции антигликановых антител, направленных к внутренним (маскированным) сайтам гликанов и их паттернов, в элиминировании раковых клеток. Это позволит предложить новую стратегию лечения и предотвращения онкологических заболеваний.

Гликочип – основной инструмент

61

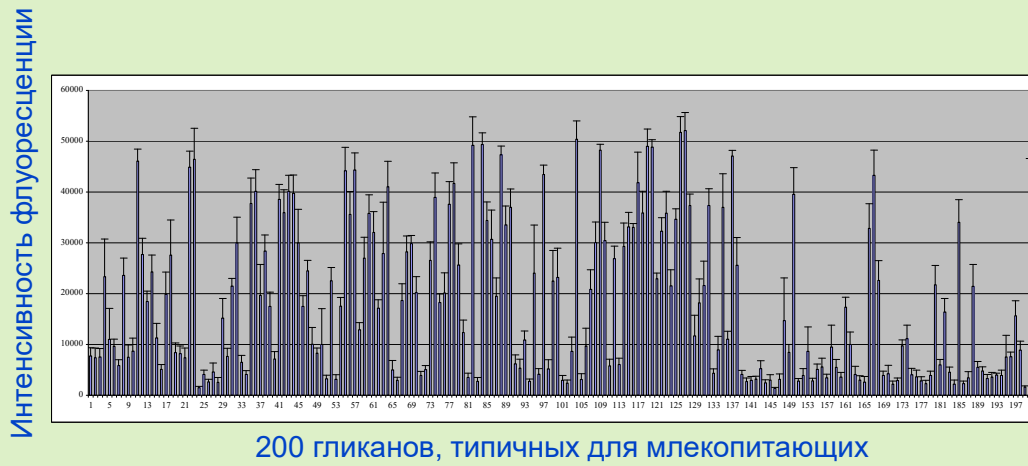


Для мониторинга репертуара и уровня гликановых антител применяют гликочипы, когда на поверхности мобилизуют набор гликанов, с которыми связываются антитела.

О факте связывания свидетельствует флуоресценция в соответствующей области слайда.

Репертуар анти-гликановых естественных антител человека

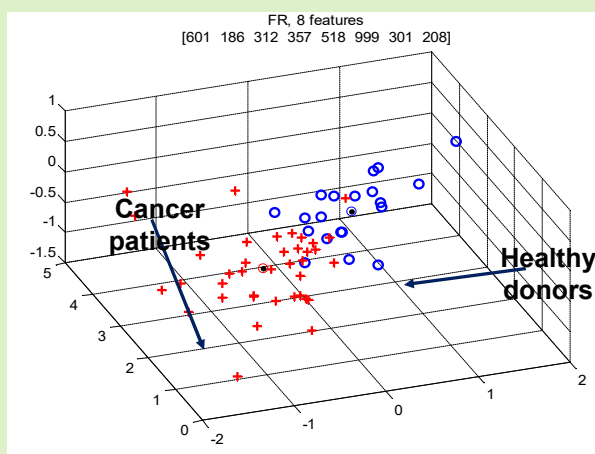
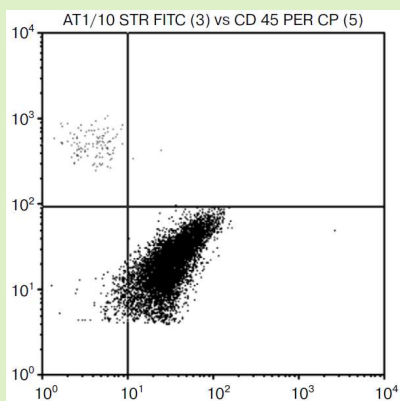
62



Здесь показано, что из 200 гликанов, типичных для млекопитающих, анти-гликановые антитела распознают большой набор этих гликанов

Профили анти-гликановых естественных антител здоровых людей и онкобольных неидентичны

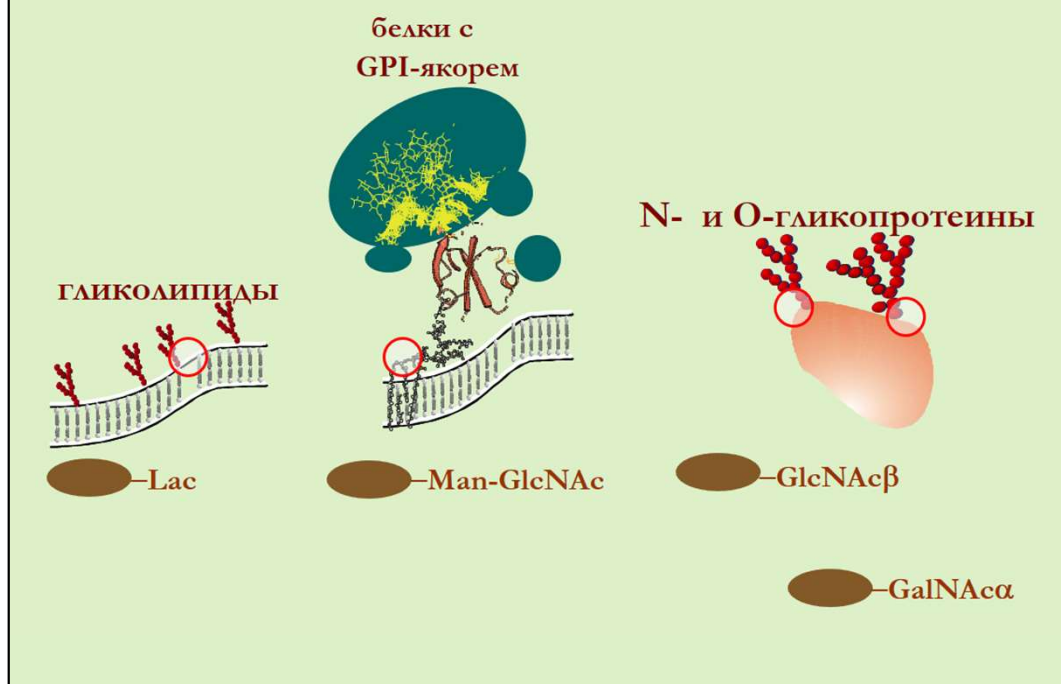
63



- ▶ **Диагностический «усилитель»:** возможна ранняя диагностика
- ▶ Для диагностики значимы совсем НЕ хорошо известные опухоль-ассоциированные антигены

Здесь приведен пример того, как различаются профили антител у здоровых людей и онкобольных. Это имеет значение для ранней диагностики рака, при этом оказалось, что антитела распознают не только хорошо известные опухоль-ассоциированные антигены, но и ранее неизвестные.

Антитела (IgM) к «коровым» участкам гликанов 64



Эти антитела часто распознают коровые структуры, находящиеся в областях присоединения гликана к полипептидной цепи. Это остатки [альфа]-галактозамина, [бета]-глюкозамина, лактозы и т.д.

**Гипотеза об антителах к коровым участкам:
это «надзорные» антитела против скрытых в
норме эпитопов**

65



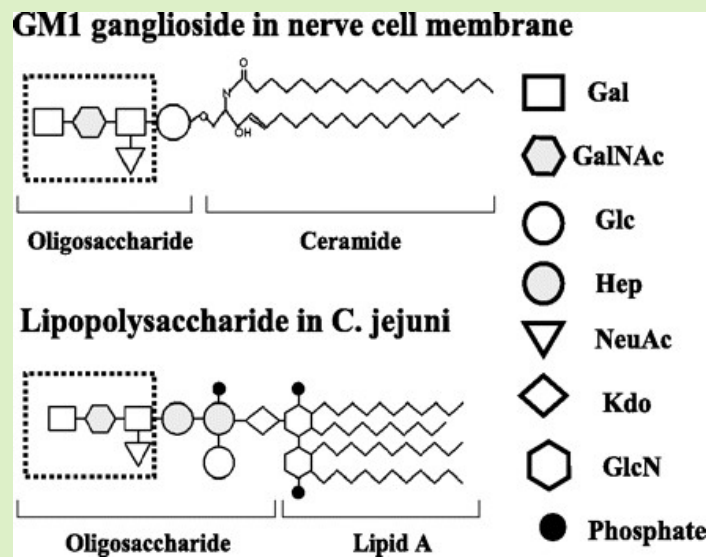
Была высказана гипотеза, что в норме антитела не распознают эти гликаны, поскольку коровые участки «закрыты» для антител, а при патологии антитела получают доступ к этим участкам.

Медицинская гликобиология

Аутоиммунные заболевания

Молекулярная мимикрия *Campylobacter jejuni*

67



Другой пример – язва желудка
(*Helicobacter pylori*): Le^X, Le^Y

При аутоиммунных заболеваниях в организме вырабатываются антитела против собственных антигенов.

Это часто бывает спровоцировано бактериальными инвазиями, потому что бактерии мимикрируют, вырабатывая структуры, сходные с углеводными структурами мембран клеток хозяина.

Здесь приведен пример сходства структур ганглиозида GM1, который в норме находится на мембране нейронов, и бактериального липополисахарида *Campylobacter jejuni*. Бактериальное инфицирование вызывает выработку антител, которые атакуют нервные клетки организма хозяина.

Аналогичная ситуация известна в отношении *Helicobacter pylori*.

Антитела к гликолипидам

68

Glycolipid	Pathology
Sulfatide	chagasic cardiomyopathy diabetic neuropathy leprosy neuropsychiatric systemic lupus erythematosus paraproteinemic neuropathy sudden deafness Guillain-Barré syndrome primary biliary cirrhosis + neuropathy chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy transverse myelitis
Neolactotetraosylceramide	hepatitis leukemia/lymphoma idiopathic thrombocytopenic purpura mixed connective tissue disease systemic lupus erythematosus
Galactosylceramide	neuropsychiatric-systemic lupus erythematosus multiple sclerosis Guillain-Barré syndrome
GalNAc-globotetraosylceramide	rheumatoid and osteoarthritis leukemia/lymphoma mixed connective tissue disease
Sulfoglucuronylparagloboside (SGPG)	paraproteinemic neuropathy Guillain-Barré syndrome chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy
Gangliosides	Guillain-Barré syndrome

Антитела к ганглиозидам – это аутоантитела, направленные организмом против компонентов собственных нейронов. Они являются специфическими маркерами острой аутоиммунной невропатии (синдрома Гийена – Барре), и их используют для того, чтобы диагностировать это заболевание и спрогнозировать его течение.

Ганглиозиды – это гликофосфолипиды, содержащие остаток сиаловой кислоты. Они встречаются в мембране многих клеток, но особенно высоко их содержание в нейронах. Они необходимы для роста и дифференцировки клеток, передачи нервного импульса, осуществления иммунных реакций. Некоторые неврологические заболевания сопровождаются выработкой аутоантител к ганглиозидам. Наиболее часто такие антитела удается обнаружить при синдроме Гийена – Барре.

Синдром Гийена – Барре – острое аутоиммунное заболевание, характеризующееся поражением периферических нервов. В подавляющем большинстве случаев заболевание развивается через 2-4 недели после перенесенной острой респираторной или кишечной инфекции. К инфекционным агентам, ассоциированным с ним, относят: *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), вирус Эпштейна – Барр, цитомегаловирус, *Mycoplasma pneumoniae*, вирус гепатита В, вирус иммунодефицита человека и некоторые другие. Защитные антитела, вырабатываемые против этих патогенов, также связываются с ганглиозидами мембран

собственных клеток. Этот феномен «молекулярной мимикрии» является основным патофизиологическим механизмом заболевания. Инфекция *C. jejuni* играет основную роль в развитии синдрома Гийена – Барре. Липоолигосахарид *C. jejuni* обладает значительным антигенным сходством с ганглиозидами GM1 и GD1b. В лабораторной диагностике аутоантитела к ганглиозидам рассматриваются в качестве специфических маркеров синдрома Гийена – Барре. Аутоантитела к ганглиозидам обнаруживаются у 60 % пациентов с синдромом Гийена – Барре. Таким образом, отрицательный результат исследования не позволяет полностью исключить заболевание.

Наиболее часто выявляют аутоантитела к ганглиозидам GM1 и GD1b. Клиническая картина синдрома неоднородна и зависит от присутствия аутоантител к различным антигенам. Выделяют несколько вариантов развития синдрома. В подавляющем большинстве случаев он протекает в классической форме в виде острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии, что сопровождается сегментарной потерей миелина периферических волокон и проявляется болью, парестезиями и парезом проксимальной группы мышц нижних, а затем и верхних конечностей (восходящий паралич). Мышечная слабость развивается остро и может в течение нескольких дней привести к параличу всех конечностей. В крови таких пациентов наиболее часто удается обнаружить аутоантитела к ганглиозиду GD1b. Присутствие аутоантител к ганглиозиду GD1b также ассоциировано с развитием тяжелых нарушений координации и равновесия (сенсорная или мозжечковая атаксия). Установлено, что наибольшая концентрация ганглиозида GD1b находится в оболочке нейронов чувствительных спинномозговых ганглиев, что объясняет атаксию при наличии аутоантител к этому ганглиозиду. В 40 % случаев острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии выявляются антитела к *C. jejuni*.

Другой клинический вариант синдрома, острая моторная аксональная невропатия, характеризуется преимущественным поражением двигательных аксонов нервных волокон при сохранении миелина, чувствительности и функции черепно-мозговых нервов. Этот вариант синдрома более характерен для детей. Ганглиозид GM1 считается основным антигеном этого заболевания. Аутоантитела, направленные против ганглиозида GM1, инициируют повреждение аксолеммы, а также блокируют потенциалзависимые кальциевые каналы. Особенностью этого клинического варианта является наличие гиперрефлексии (в отличие от «классического» варианта синдрома, при котором наблюдается гипорефлексия). Гиперрефлексия ассоциирована с наличием в крови аутоантител к ганглиозиду GM1. В 75 % случаев в крови таких больных выявляются антитела к *C. jejuni*.

Ганглиозид GQ1b – основной антиген при синдроме Миллера-Фишера, варианте

синдрома Гийена – Барре. Аутоантитела к GQ1b инициируют и поддерживают воспалительную реакцию, приводящую к разрушению миелина. Клиническая картина заболевания обусловлена тем, что наибольшая концентрация ганглиозида GQ1b отмечена в миелиновой оболочке черепно-мозговых нервов, иннервирующих мышцы глазного яблока, и в некоторых крупных нервных стволах конечностей. Наиболее специфичным тестом, позволяющим подтвердить диагноз «синдром Миллера-Фишера», является исследование крови на аутоантитела к ганглиозиду GQ1b.

Следует отметить, что зачастую в крови пациентов с различными клиническими формами синдрома удается выявить сочетание различных аутоантител к ганглиозидам.

Как правило, неврологический дефицит при синдроме Гийена – Барре полностью восстанавливается в течение 6-12 месяцев. Результат анализа становится отрицательным в период выздоровления, однако у 7-15 % пациентов неврологические нарушения сохраняются на всю жизнь. Стойкое обнаружение аутоантител к ганглиозиду GM1 ассоциировано с более длительным периодом восстановления.

Аутоиммунной нейропатии также могут способствовать неинфекционные заболевания (системная красная волчанка), онкологические заболевания крови (особенно лимфома Ходжкина). По этой причине при положительном результате исследования аутоантител к ганглиозидам и подтверждении диагноза «синдром Гийена – Барре» целесообразно проведение дополнительных общеклинических тестов. Кроме того, рекомендуется проведение дополнительных лабораторных тестов для исключения других, более частых причин периферической нейропатии (дефицита витамина B12, диабетической нейропатии, гипотиреоза).

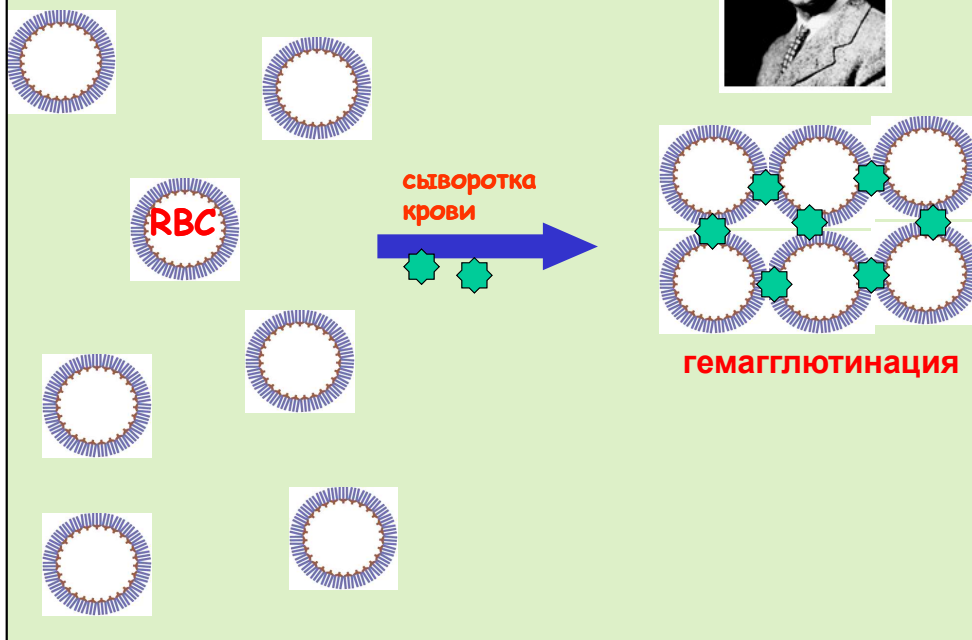
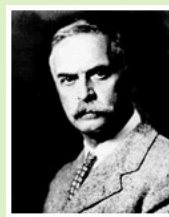
Медицинская гликобиология

Трансплантация и переливание крови

Важный аспект медицинской гликобиологии связан с проблемой трансплантации органов и переливания крови

К. Ландштайнер, 1900 г.

70



Более ста лет назад было обнаружено, что сыворотка крови может вызывать агглютинацию эритроцитов

Система АВ0

71

Группа крови				
	Структура антигена на эритроцитах и <u>тканях</u>	Название антигена	Наличие антител у человека с данной группой крови	Особенности как донора
0 (I)	Fuc α 1-2Gal	H	анти-A + анти-B	универсальный донор
A (II)	Fuc α 1-2Gal GalNAc α 1-3	A	анти-B	только для реципиентов A и AB
B (III)	Fuc α 1-2Gal Gal α 1-3	B	анти-A	только для реципиентов B и AB
AB (IV)	оба		ни тех, ни других	совместим только с AB

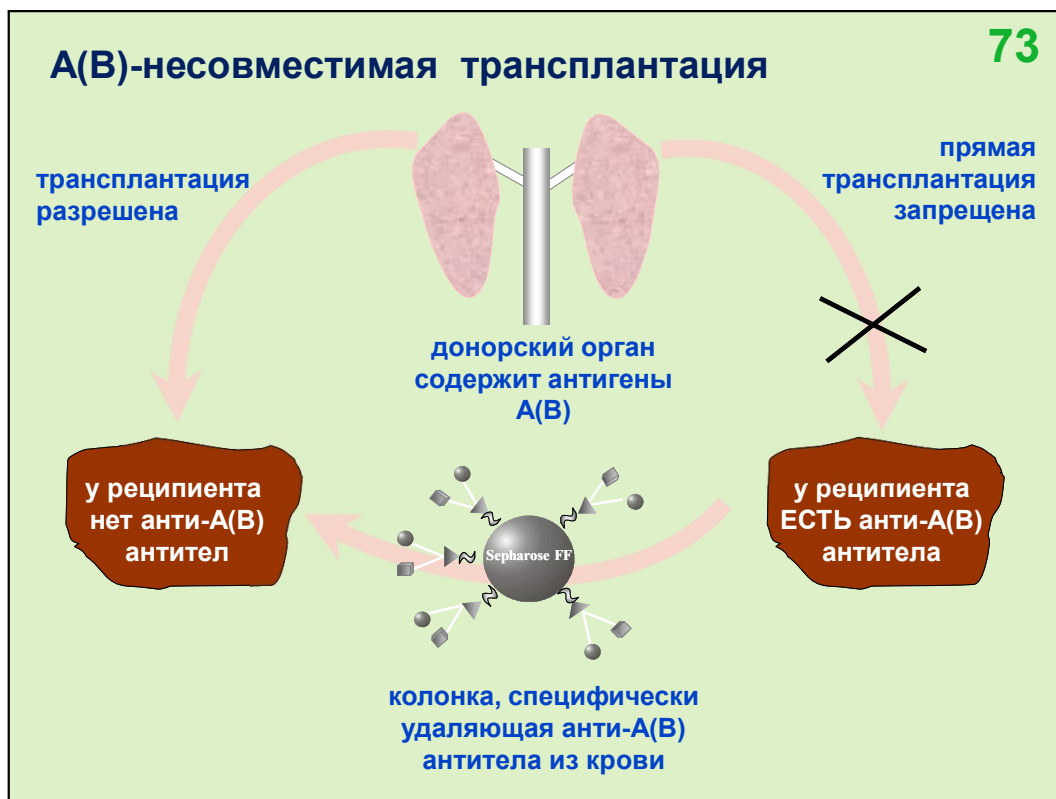
Причиной агглютинации является присутствие на мембране эритроцитов углеводных антигенов (H, A,B), а в сыворотке крови – антител. Важно, что такие антигены есть не только на эритроцитах, но и на эпителии.

33 Системы групп крови

72

No.	System name	System symbol	Chromosomal location	CD numbers
001	ABO	ABO	9q34.2	
002	MNS	MNS	4q31.21	CD235
003	P	P1	22q11.2-qter	
004	Rh	RH	1p36.11	CD240
005	Lutheran	LU	19q13.32	CD239
006	Kell	KEL	7q34	CD238
007	Lewis	LE	19p13.3	
008	Duffy	FY	1q23.2	CD234
009	Kidd	JK	18q12.3	
010	Diego	DI	17q21.31	CD233
011	Yt	YT	7q22.1	
012	Xg	XG	Xp22.33	CD99†
013	Scianna	SC	1p34.2	
014	Dombrock	DO	12p12.3	CD297
015	Colton	CO	7p14.3	
016	Landsteiner-Wiener	LW	19p13.2	CD242
017	Chido/Rodgers	CH/RG	6p21.3	
018	H	H	19q13.33	CD173
019	Kx	XK	Xp21.1	
020	Gerbich	GE	2q14.3	CD236
021	Cromer	CROM	1q32.2	CD55
022	Knops	KN	1q32.2	CD35
023	Indian	IN	11p13	CD44
024	Ok	OK	19p13.3	CD147
025	Raph	RAPH	11p15.5	CD151
026	John Milton Hagen	JMH	15q24.1	CD108
027	I	I	6p24.2	
028	Globoside	GLOB	3q26.1	
029	Gill	GIL	9p13.3	
30	Rh-associated glycoprotein	RHAG	6p21-qter	CD241
31	Forssman	Fs	Fs	

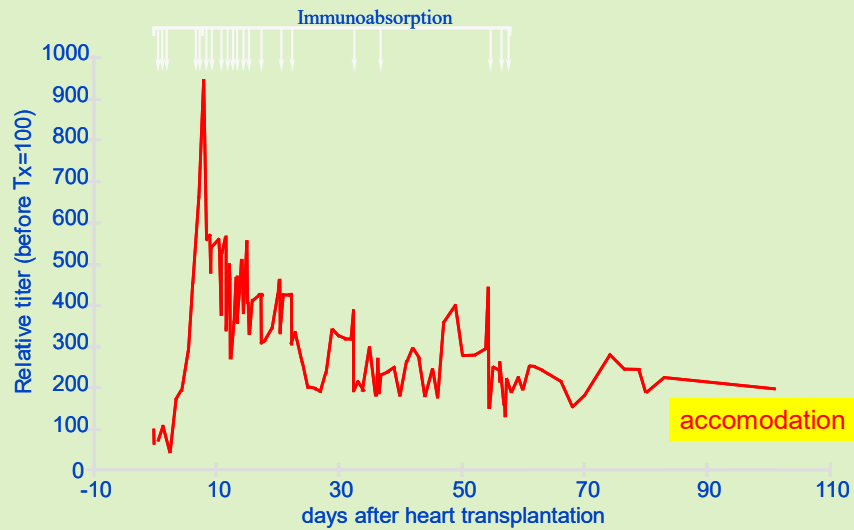
Эта таблица показывает разнообразие систем групп крови, а полосами выделены те системы, которые основаны на типировании углеводных антигенов.



Наличие антигенов, типированных по системе АВО, учитывается при трансплантации органов. Трансплантация невозможна, когда донорский орган имеет антигены, а у реципиента есть соответствующие антитела в сыворотке, поскольку орган будет отторгнут. Однако аффинной хроматографией можно удалить из крови реципиента антитела при помощи углеводных сорбентов.

Уровень анти-В антител в крови пациента с «неправильно» пересаженным сердцем: динамика адсорбции

74



Если такую иммуноадсорбцию провести после пересадки, то через некоторое время титр антител падает, и орган приживается.

**Ксенотрансплантация
(пересадка органов между разными видами)**

75

α -Gal эпитоп ($\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc-R}$)

	фермент α Gal-трансфераза	антиген $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$	антитела к $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$
свинья	есть	есть	нет
человек	нет	нет	высокий уровень

Трансгенные свиньи

Пересадка органов между разными видами тоже затруднена из-за присутствия углеводных антигенов, как например, [альфа]-галактозный эпитоп. И поначалу предполагали, что трансгенные животные, не имеющие таких эпитопов, решат проблему ксенотрансплантации.



Но, как это обычно бывает, все оказалось сложнее. На этой схеме хорошо видно, что взаимодействие с [альфа]-гал-эпитопом занимает очень маленькую долю этой очень сложной системы в организме, которая не хочет принимать чужое.

Медицинская гликобиология

Рекомбинантные гликопротеины

Рекомбинантные гликопротеины

78

Системы экспрессии:

- *E. coli*
- дрожжи
- CHO

ПРИМЕРЫ:

- Церредаза (GlcCer-глюкозидаза)
- GM-CSF (гранулоцит- макрофаг колониестимулирующий фактор)
- IL (интерлейкины)
- EPO (эритропоэтин)

ПРОБЛЕМЫ:

(возникают, если гликозилирование неправильное, или вовсе отсутствует)

- нет активности
- неправильная фармакокинетика
- нестабильность
- иммуногенность (α Gal)

Существуют разные системы экспрессии: бактериальные, дрожжевые и т.д. Неправильное гликозилирование (или его отсутствие) рекомбинантных гликопротеинов приводит либо к потере их активности, либо к нарушениям фармакокинетики, либо к нестабильности или иммуногенности получаемых гликопротеинов.

Системы экспрессии: гликозилирование?

79

Generic Designation	Therapeutic Protein	Expression System	Glycosylation ^a
Agalsidase alfa	α -galactosidase A	Human cell line	N-links [5, 6]
Agalsidase beta	α -galactosidase A	CHO cells	N-links [5, 6]
Aldesleukin	Interleukin 2	<i>E. coli</i>	None
Alefacept	The extracellular CD2-binding portion of the human leukocyte function antigen-3 (LFA-3) linked to the Fc portion of human IgG1	CHO cells	N-links [7]
Algulcosidase alfa	Acid glucosidase	CHO cells	N-links [8, 9]
Alteplase	Tissue plasminogen activator	CHO cells	N-links [10–13]
Anakinra	Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra)	<i>E. coli</i>	None
Anti-hemophilic factor	Factor VIII	BHK & CHO cells	N-links & O-links [14, 15]
Antithrombin alfa	Antithrombin	Transgenic goat's milk	N-links [16, 17]
Becaplermin	Platelet-derived growth factor	<i>S. cerevisiae</i>	None
Calcitonin-salmon	Salmon calcitonin	<i>E. coli</i>	None
Chorionic Gonadotropin alfa	Chorionic Gonadotropin	CHO cells	N-links & O-links [18–20]
Darbepoietin alfa	Engineered erythropoietin with 2 extra N-glycans (long-acting)	CHO cells	N-links & O-links [21, 22]
Denileukin diftitox	Diphtheria toxin fragments A and B (Met1-Thr387)-His followed by the sequences for interleukin-2 (IL-2; Ala1-Thr133)	<i>E. coli</i>	None
Dibotermin alfa	Bone morphogenic protein 2 (BMP-2)	CHO cells	N-links
Dornase alfa	Deoxyribonuclease I	CHO cells	N-links [23]
Drotrecogin alfa (activated)	Activated Protein C	Human kidney cell line (293 cells)	N-links [24]

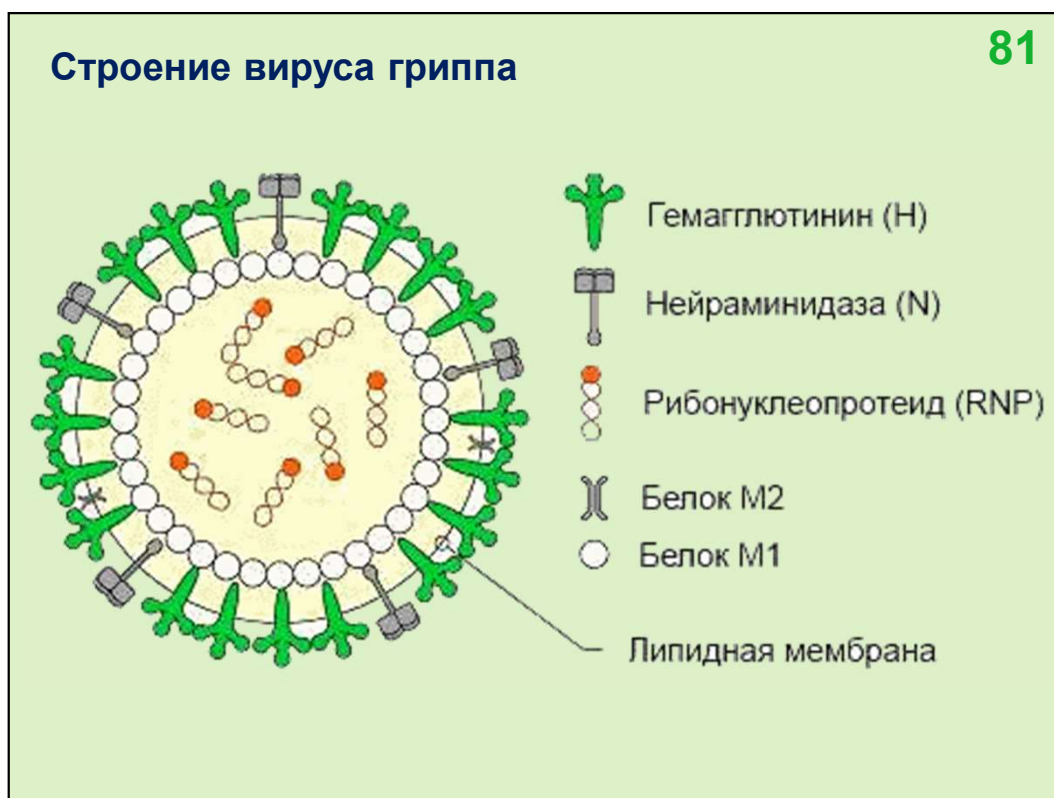
Поэтому таких систем экспрессии очень много. Часто ненужные гликаны удаляют ферментативно. А потом пытаются каким-либо образом присоединить нужные гликаны. Обычно, не слишком успешно. В настоящее время проблема ПОСТ-трансляционного гликозилирования генных продуктов стоит очень остро. Напомню, что гликозилирование природных гликопротеинов протекает КО-трансляционно. Это мы обсуждали на лекции 3.

Медицинская гликобиология

**Вирус гриппа:
ингибиторы нейраминидазы**

Строение вируса гриппа

81



Препараты для борьбы с вирусом гриппа также основаны на ингибировании второго важного белка поверхности вируса гриппа – нейраминидазы.

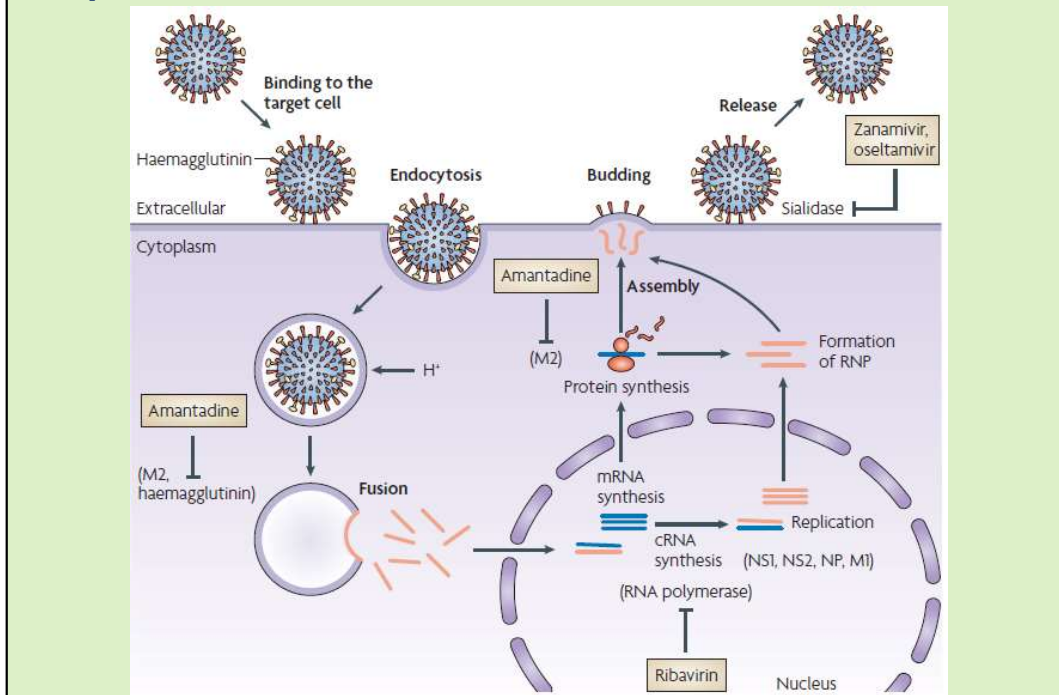
Структура вируса гриппа. Белок M2, который присутствует только в вирусах гриппа А, подавляется трициклическими аминами, такими как амантадин.

Осельтамивир подавляет вирусную нейраминидазу.

Осельтамивир (Тамифлю) является пролекарством осельтамивира карбоксилата (GS4071), мощный ингибитор нейраминидазы вируса гриппа. Осельтамивир был разработан из-за плохой биодоступности занамивира, ингибитора нейраминидазы, структурно похожего на GS4071. Нейраминидаза присутствует на поверхности вируса гриппа А и вируса гриппа В (рисунок 2). Вирусная нейраминидаза отщепляет остатки сиаловой кислоты на поверхности инфицированных клеток, что позволяет новым вирусным частицам высвободиться из клеток-хозяев. Также она предотвращает агрегацию вирусных частиц после их выпуска и способствует распространению вируса через слизь респираторного тракта, отщепляя остатки сиаловой кислоты в муцинах.

Жизненный цикл вируса гриппа: мишени для терапии

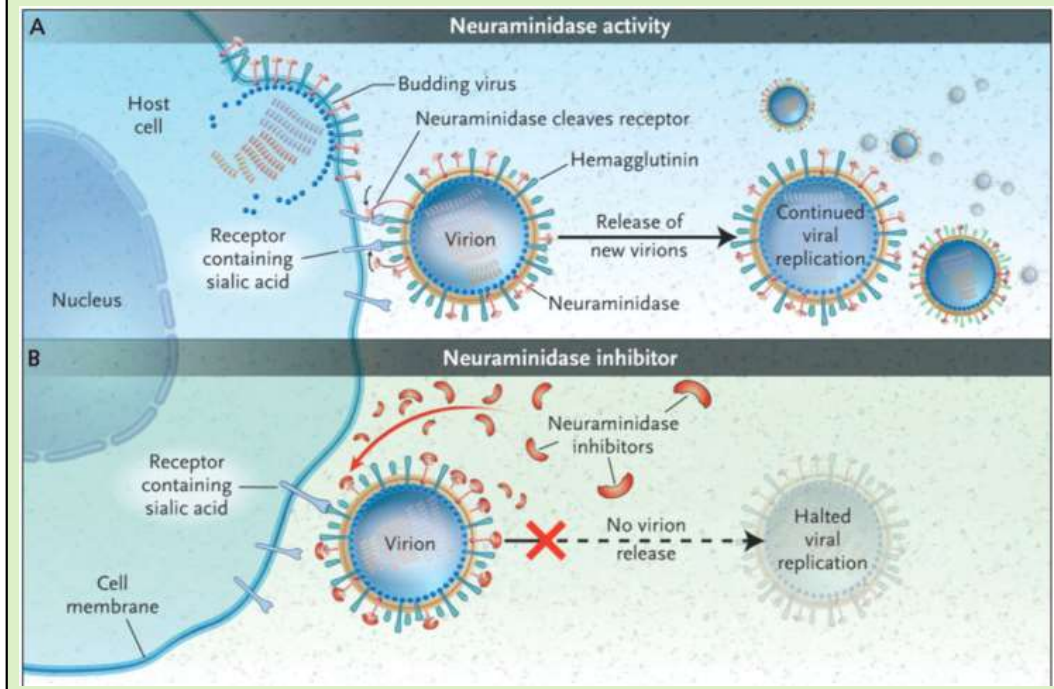
82



Второй этап жизненного цикла вируса гриппа связан с отделением его вириона от поверхности

Ингибирование нейраминидазы – остановка жизненного цикла вируса гриппа

83

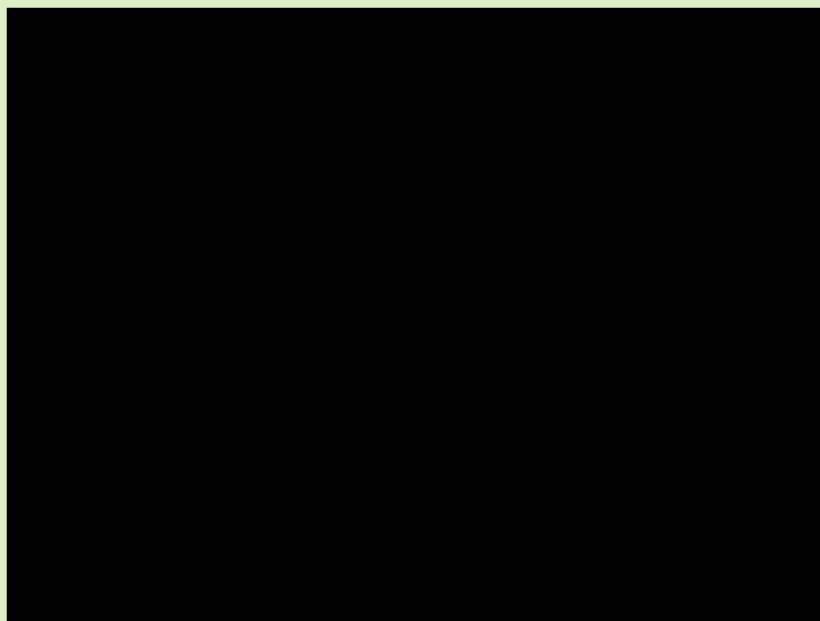


Размножение вируса гриппа можно предотвратить, ингибируя нейраминидазу – фермент, отщепляющий остаток сиаловой кислоты в гликопротеинах на мембране клетки хозяина. Благодаря таким ингибиторам вирион гриппа не отделяется от клетки хозяина, что останавливает жизненный цикл вируса.

(A) The action of neuraminidase in the continued replication of virions in the setting of influenza infection. The replication is blocked by neuraminidase inhibitors (B), which prevent virions from being released from the surface of infected cells. (C) Binding of oseltamivir and zanamivir to the neuraminidase-active sites. (D) With mutation, a conformational change at the binding site prevents binding of oseltamivir but permits binding of zanamivir. (Images obtained from *N Engl J Med* 2005;353:1363–73 and *N Engl J Med* 2005;353:2633–6 and reprinted with permission of the publisher. Copyright © 2005 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.)

Вирус гриппа: жизненный цикл и ингибиторы

84



Видео доступно на сайте углеводы.ru

Механизм действия нейраминидазы вируса гриппа

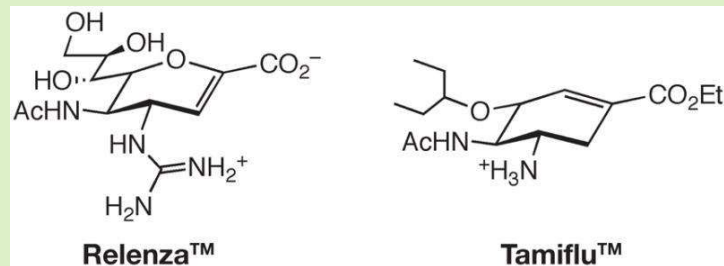
85



Разработка ингибиторов нейраминидазы основана на особенностях механизма ее действия. Один из вариантов ингибиторов – создание положительно заряженной молекулы, которая хорошо удерживается в активном центре фермента, второй вариант – это имитировать образование ковалентного интермедиата.

Relenza™ и Tamiflu™: «родственность» строения

86



Первое направление – создание положительно заряженной группы в производном, напоминающем гликозил-катион, имеющем такую же специфическую конформацию, который содержит остаток замещенной сиаловой кислоты, который замещен определенным образом.

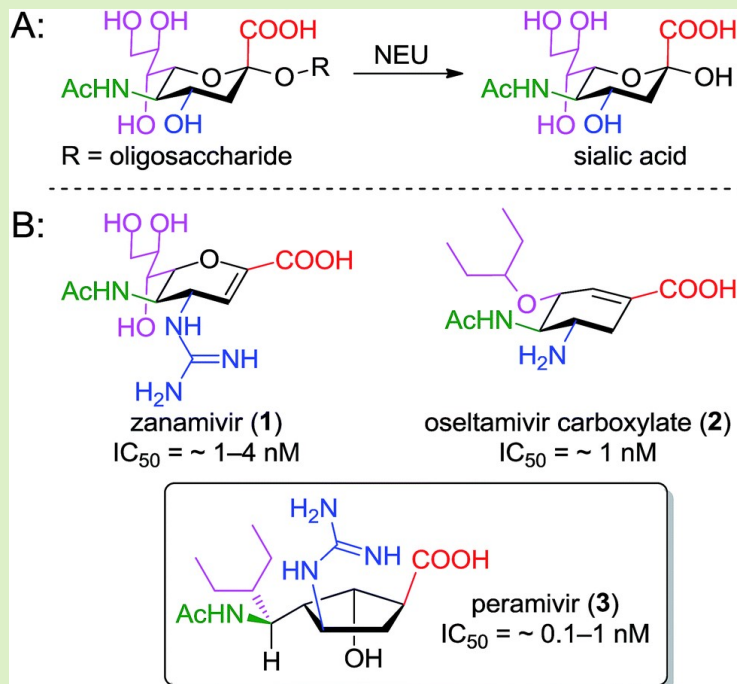
Слева - первый препарат такого типа., который эффективно ингибирует нейраминидазу. Он продается в аптеках под названием Relenza.

Официальное название этого препарата – занамивир.

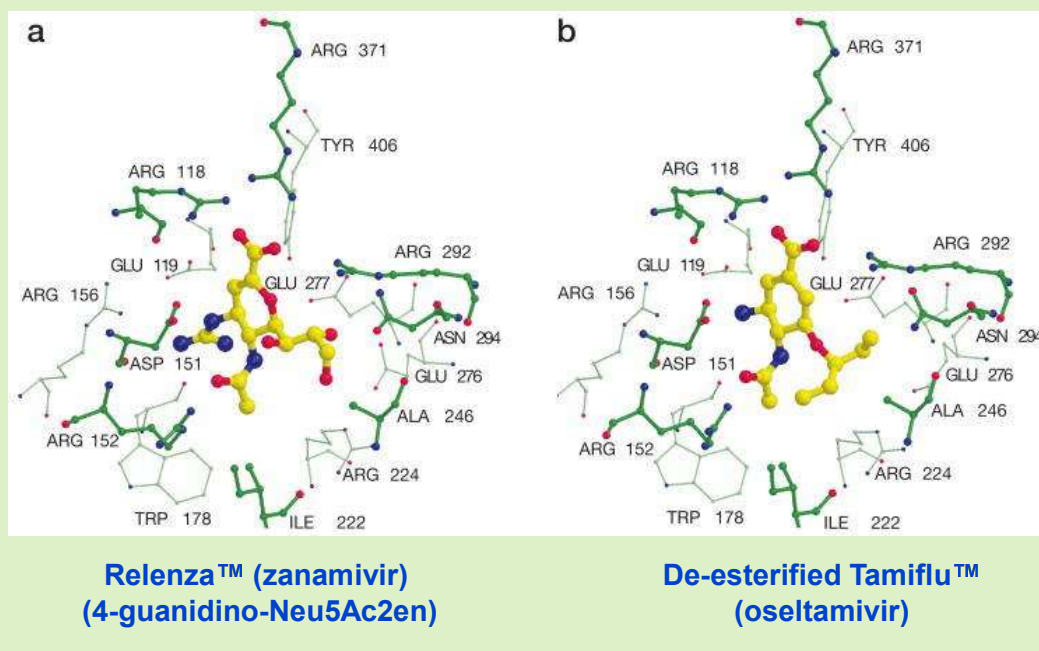
Дальнейшие изыскания привели к разработке второго препарата, который обладал большей биодоступностью и повышенной эффективностью ингибирования. Т.е. он был более эффективным. Структура сходна.

Однако это уже НЕ сахар, а производное циклогексана в сходной конформации. По-прежнему есть карбоксильная группа, есть положительный заряд. А глицериновую цепь имитирует разветвленный алкильный заместитель. Подчеркну, что это препарат Tamiflu (Официальное название этого препарата – озельтамивир) выпускается в виде про-лекарства. Дело – в этом этиловом эфире, который в организме гидролизуется с образованием активного вещества, которое как раз и ингибирует нейраминидазу.

Ингибиторы нераминидазы вируса гриппа



Есть и другие, более сложные по строению, ингибиторы нейраминидазы. Например с пятичленным циклом вместо шестичленного. Но идея та же. Необходимо присутствие положительного заряда, необходима карбоксильная группа и нужен гидрофобный довесок, который имитирует боковую цепь нейраминовой кислоты.



Здесь показано, как по-разному располагаются эти ингибиторы в активном центре фермента.



Эти различия в комплексообразовании ингибиторов с нейраминидазой оказались критически важными во время пандемии свиного гриппа 2009 года.

Резистентность вирусов гриппа к препаратам

90

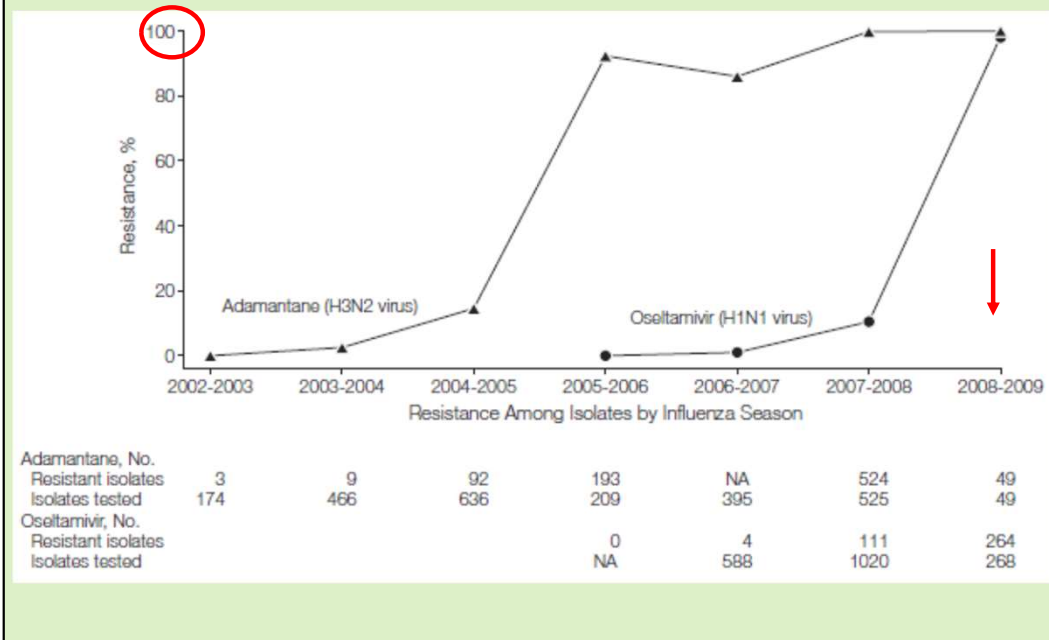
Таблица 1. Сводные данные о преобладании устойчивости к противовирусным препаратам у циркулирующих в настоящее время вирусов сезонного гриппа в течение сезона 2008-2009 в северном полушарии.

	% устойчивых к противовирусным препаратам изолятов из числа протестированных во всем мире (количество протестированных изолятов)		
	озельтамивир	занамивир	адамантаны
Сезонный грипп типа А (H1N1)	96% (3902)	0% (447)	2% (1821)
Сезонный грипп типа А (H3N2)	0% (1027)	0% (724)	100% (1150)
Вирус гриппа типа В	0% (703)	0% (621)	-

Пандемия свиного гриппа выявила, что очень быстро вырабатывается резистентность вируса к препаратам.

Устойчивость вирусов гриппа H1N1 к озельтамивиру в США

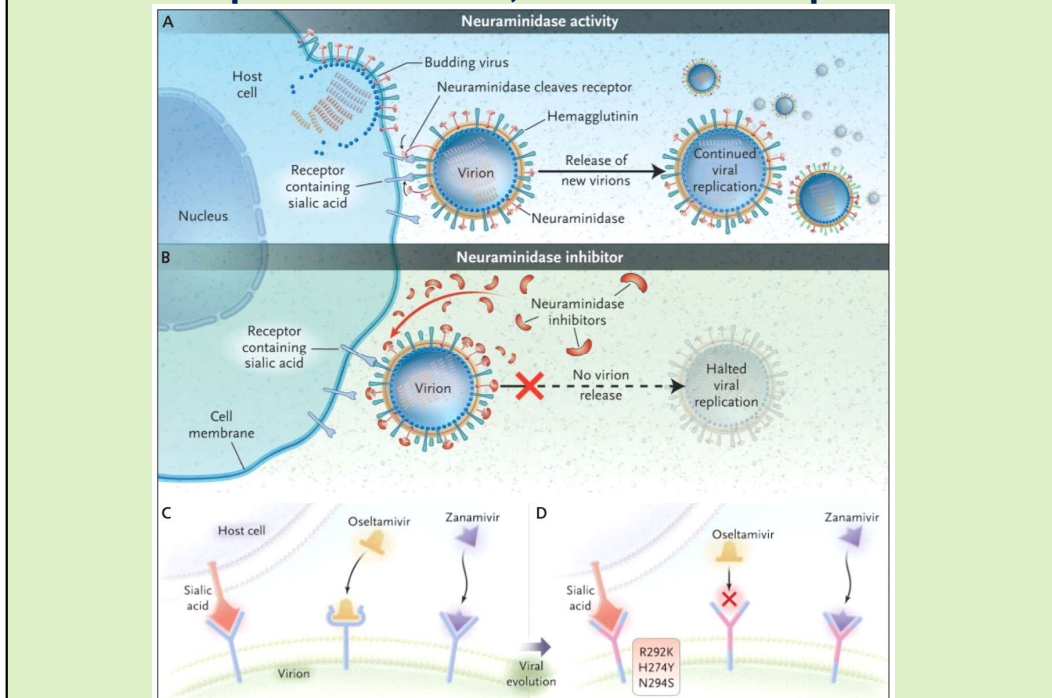
91



За пару лет вирус гриппа выработал резистентность к Тамифлю (Официальное название этого препарата – озельтамивир). И этот замечательный препарат стал не работающим.

Результат мутации – резистентность: занамибир связывается, а озельтамивир нет

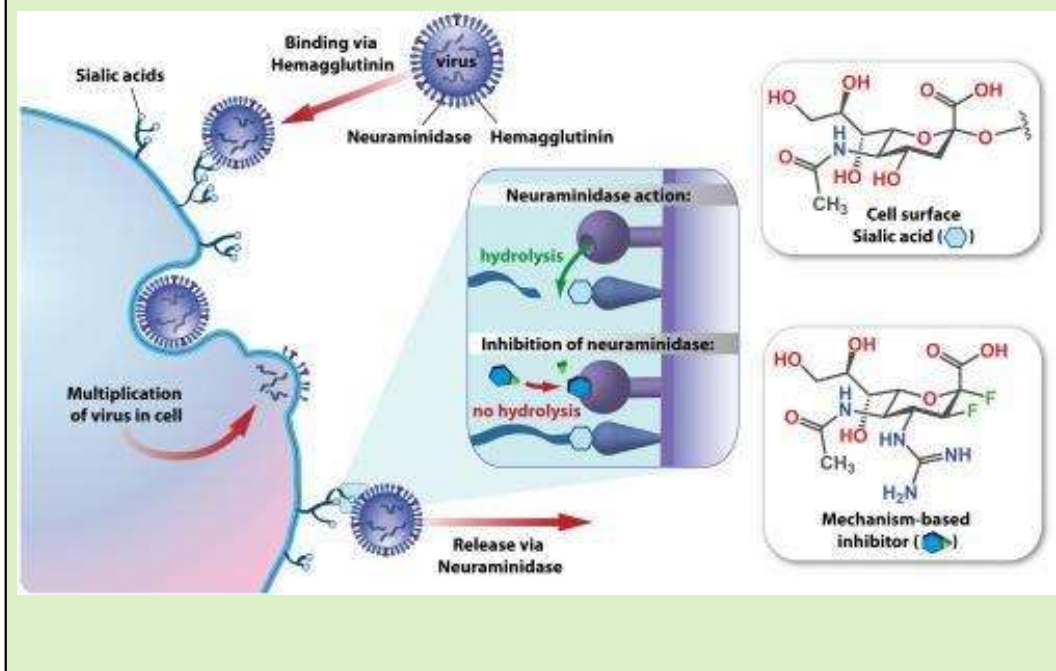
92



До того, как началась пандемия этот препарат – озельтамивир - отлично связывался с нейраминидазой и ингибировал ее действие. А затем в результате показанных на слайде аминокислотных замен озельтамивир утратил способность ингибировать нейраминидазу вируса гриппа. В то же время – второй препарат – занамибир – не утратил способность ингибировать нейраминидазу. Вследствие различий в структуре комплексов этих препаратов с нейраминидазой молекулы контактировали с разными аминокислотами в активном центре фермента. Поэтому мутация не повлияла на активность второго препарата – занамивира. Это было большой удачей. Этот препарат можно было использовать для лечения гриппа.

Ингибиторы, ковалентно связывающиеся с нейраминидазой («сломанный ключ в замке»)

93



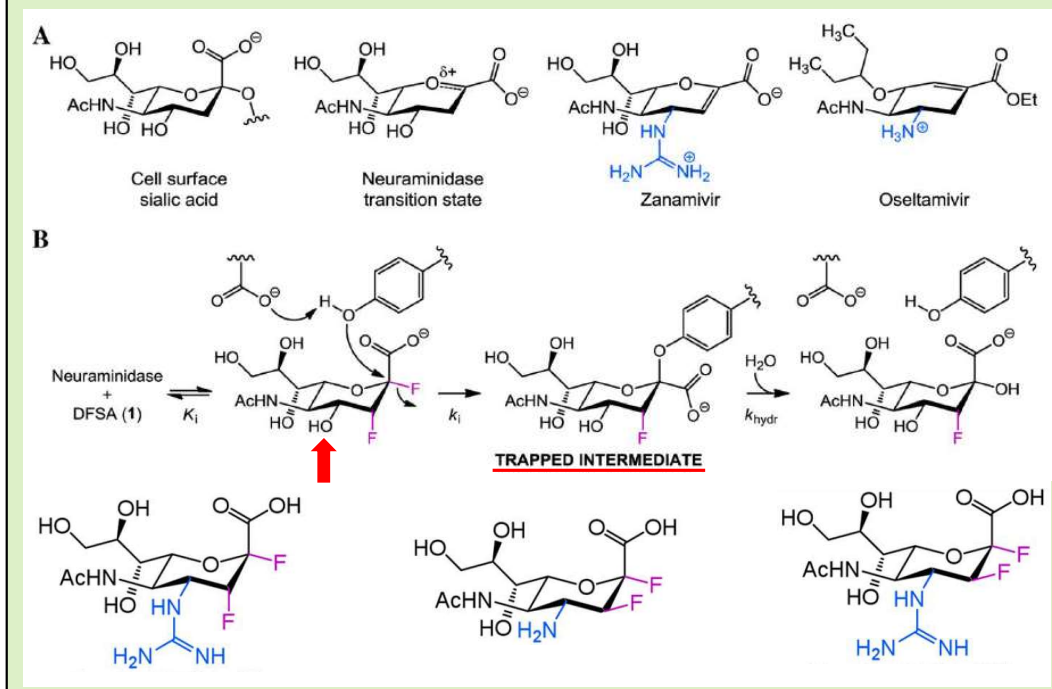
Второе направление - создание ковалентных интермедиатов типа «сломанный ключ – замок».

Вспомним, что в ходе гидролиза гликозидов сиаловых кислот промежуточно образуется не только гликозил-катион, но и ковалентный интермедиат с ферментом.

Речь идет о развитии концепции ключ-замок. Мы вставляем ключ в замок, а затем его ломаем.

Ингибиторы, ковалентно связывающиеся с нейраминидазой (“mechanism-based inhibitors”)

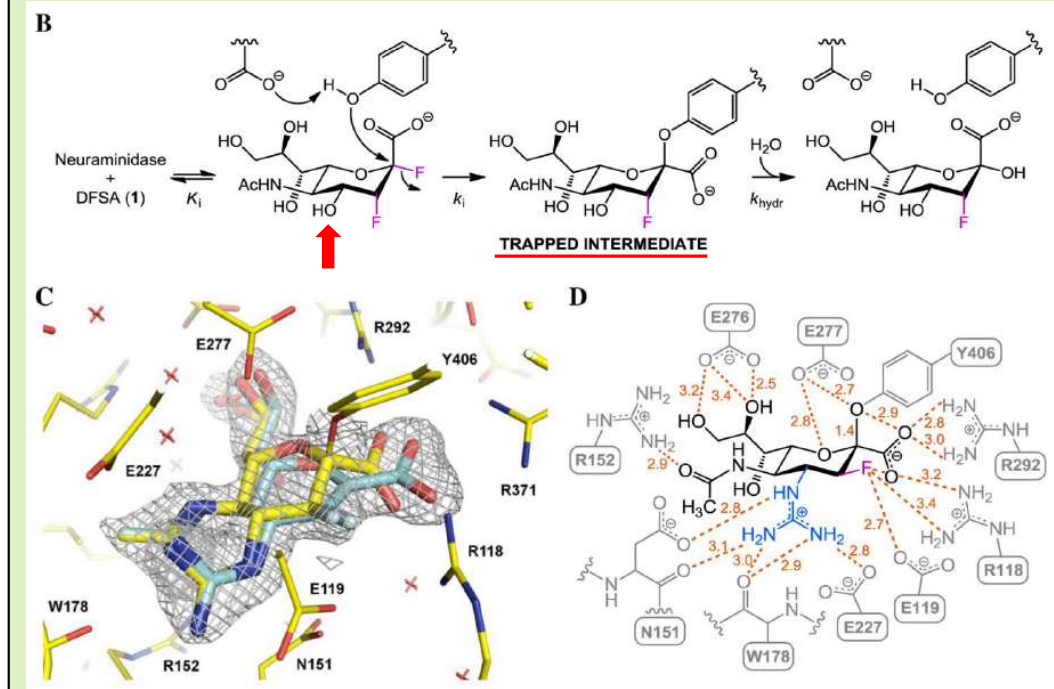
94



Это примеры таких интермедиатов, реагирующих ковалентно с остатком тирозина.

Ингибиторы, ковалентно связывающиеся с нейраминидазой (“mechanism-based inhibitors”)

95



Это направление считается в настоящее время более перспективным.

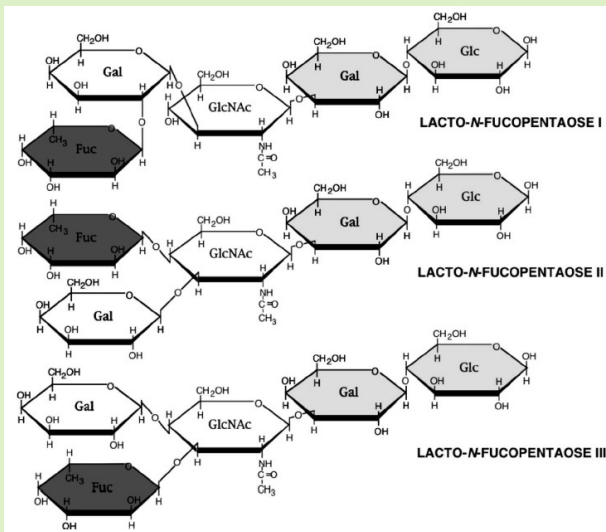
Медицинская гликобиология

Общие вопросы

Как борется наш организм с патогенами?

97

- ▶ Муцины, олигосахариды молока, секреторные антитела IgA (sIgA) и др.
- ▶ «Ловушки»-макрофаги
- ▶ Эволюционные изменения углеводных цепей:
в частности, антигенов ABO и ксено-антигенов; появление соответствующих антител.



Защита организма от патогенов с использованием углеводов включает: углеводные компоненты муцинов, олигосахаридов молока, секреторные иммуноглобулины (sIgA).
лектины на макрофагах, распознающие углеводные структуры патогенов.
эволюционные изменения углеводных цепей на поверхности клеток хозяина.

Разнообразие как эволюционный путь выживания человека, или зачем нужны группы крови?

98

▶ Межвидовые различия:

- ▶ Антитела к ксено-антигену Gal α 1-3Gal – это барьер для вирусной инфекции животное → человек (вирус использует гликозилирующий аппарат клетки-хозяина)

▶ Внутривидовые различия:

- ▶ Антигены групп крови (например, системы АВН) как рецепторы адгезии, являются барьером для внутривидового инфицирования.

Межвидовые и внутривидовые различия углеводных структур, экспрессируемых на поверхности клеток хозяина, обеспечивает выживание вида в ходе его эволюционного развития.

Гены, ответственные за группу крови

99

Фено-тип	Агглю-тинация	Аминокислотная замена в ферменте
A ₁	A	-
A ₂		156(Pro→Leu)
A ₃		291(Asp→Asn)
A _x		216(Phe→Ile)
<i>cis</i> -AB		156(Pro→Leu), 268(Gly→Ala)
B(A)		176(Arg→Gly), 266(Leu→Met), 268(Gly→Ala)
B	B	176(Arg→Gly), 235(Gly→Ser), 266(Leu→Met), 268(Gly→Ala)
0		сдвиг рамки считывания

А-трансфераза:
донор - GalNAc-UDP

В-трансфераза:
донор - Gal-UDP

Аналогичным образом, если рассмотреть группы крови, оказывается, что это возникновение новых групп крови - это постепенный процесс, важный для выживания.

В ходе эволюции гликозилтрансфераза, которая переносит остаток N-ацетилгалактозамина на олигосахаридный предшественник (H-антиген), т.е. А-трансфераза претерпела ряд мутаций, которые привели к возникновению ряда вариантов этого фермента, что приводит к наличию вариантов углеводных структур. Соответствующие эритроциты различаются фенотипом и агглютинируют в разной степени с одними и теми же антителами. Это постепенный переход от А-антигена к В-антигену. Более того, сдвиг рамки считывания приводит отсутствию гликозил-трансферазной активности у этого полипептида. Никакой из сахаров не переносится. Это H-фенотип. Присутствуют оба типа антител: анти-А + анти-В.

Конец лекции 7

<https://углеводы.su>

Список рекомендуемой литературы

101

все файлы – на сайте углеводы.su Пароль: ****

IN ENGLISH:

6. *Essentials of glycobiology*, A. Varki et al. (Eds.), 3^d edn., 2017.
Открытый доступ к книге (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274>).
Доступен файл 1-го издания (1999).
7. *Comprehensive Glycoscience. From Chemistry to System Biology*, 2007.
9. *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*, 2008. Глава 1: Ch1_General Aspects.
42. I. Robina, et al. *Glycosylation Methods in Oligosaccharide Synthesis. Curr. Org. Synth.*, 2008. Доступен файл обобщающего обзора (2005; 75 стр.).

ПО-РУССКИ:

3. Т. С. Орецкая и др., *Моно- и дисахариды*, 2010, тт. 1 и 2.
13. Н. К. Кочетков и др. *Химия углеводов*. 1967.
15. А. Ф. Бочков и др., *Углеводы*. 1980.
16. Р. Хьюз. *Гликопротеины*. 1985.

Примечание: Нумерация литературы соответствует списку на сайте углеводы.su

В целом, содержание лекций и логика изложения во многом соответствуют книге *Essentials of glycobiology*, что можно перевести как **ОСНОВЫ ГЛИКОБИОЛОГИИ**. Это наше основное пособие. Книга написана как учебник для студентов и аспирантов. Если вы ее прочтете и усвоите то, что там написано, то сдадите экзамен без проблем (по крайней мере, теоретический вопрос).

Содержание сильно зависит от издания. Последнее (третье) издание более структурировано, содержит меньше деталей и частных и дает более четкое представление о предмете. В предыдущем (втором) издании можно найти больше подробностей по ряду вопросов, иллюстрации также более разнообразны. Лично мне больше всего нравится первое издание. Оно больше всего похоже на учебник. На сайте есть файл. У этой книги только один недостаток – она написана по-английски.

Однако эта книга мало освещает химические аспекты углеводов, хотя базовая информация там определенно есть. Напомню, что наш курс называется “ХИМИЯ УГЛЕВОДОВ И ГЛИКОБИОЛОГИЯ”. Вопросы химического синтеза олигосахаридов и методов создания гликозидных связей хорошо изложены книге *Handbook of Chemical Glycosylation*. Прежде всего, обратите внимание на первую вводную главу. Для сдачи экзамена я рекомендую ознакомиться с чуть более ранним обобщающим

обзором, где эти вопросы освещены более подробно и глубоко. Файл доступен на сайте под номером 42.

Так случилось, что книг на русском языке немного. Поэтому хорошим дополнением являются отечественная книга *Углеводы* и переводная книга *Гликопротеины*. Хотя они изданы давно, они по-прежнему актуальны и являются хорошим введением в гликобиологию, особенно для начинающих.

Основная книга практически по всем разделам химии углеводов на русском языке – это *Химия углеводов*, написанная Кочетковым и его сотрудниками полвека назад. Так называемая, ЧЕРНАЯ КНИГА. И хотя некоторые частности, без сомнения, устарели, основы химии углеводов там изложены очень хорошо. Я рекомендую эту вроде бы антикварную книгу как источник базовой информации по химии углеводов.

Обязательно ознакомьтесь с двухтомником Орецкой, используемым на химфаке МГУ. Для нашего курса там нужно далеко не все, но вводные главы первого тома и главы по стереохимии моносахаридов в первом и втором томах надо прочитать.

По ходу изложения материала я иногда буду упоминать отдельные книги и обзоры из списка литературы, имеющие отношение к той или иной частной проблеме. В таком случае с ними рекомендуется ознакомиться (это вам поможет на экзамене). Это в основном будут отдельные главы из книги под номером 7 - *Comprehensive Glycoscience*. Там есть практически все! Предупреждаю, что это издание для профессионалов, а не учебник.

Подчеркну, что нумерация литературы в презентации соответствует списку на сайте.

Для вашего удобства файлы всех нужных книг и статей доступны на сайте. Для загрузки файлов вам будет нужен пароль. Вот он. Запишите его сейчас.