

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИУГЛЕВОДНЫХ АНТИТЕЛ В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Обзор

© 2015 Д. Белло-Джил¹, Р. Манец^{1,2*}

¹ Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL),
Gran Via de l'Hospitalet, 199 08908 Hospitalet de Llobregat, Spain

² Bellvitge University Hospital, Feixa Llarga s/n 08907,
Hospitalet de Llobregat, Spain; E-mail: rmanez@bellvitgehospital.cat

Поступила в редакцию 04.03.15

После доработки 13.04.15

Естественные антиуглеводные антитела (NAbC) представляют собой постоянно синтезирующиеся в отсутствие явной внешней антигенной стимуляции антитела, направленные на гликаны. В клинической практике NAbC распознаются по нежелательной реакции на несовпадение групп крови при переливании крови или трансплантации органов, а также по отторжению ксенотрансплантантов. Эти клинические проявления не отражают биологической роли NAbC. Однако они позволяют предположить возможность использования NAbC для усиления иммунитета в различных клинических условиях путем: 1) экспрессии углеводных антигенов в элементах, где они отсутствуют, что позволит использовать связывание и реакционную способность существующих NAbC; 2) удаления существующих NAbC; 3) изменения рисунка гликозилирования NAbC.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: естественные антитела, антиуглеводные антитела, антитела к группам крови, анти-галактоза α 1,3 галактозные антитела.

ЕСТЕСТВЕННЫЕ АНТИУГЛЕВОДНЫЕ АНТИТЕЛА

Естественные антитела (NAb) представляют собой иммуноглобулины (в основном изотипа IgM), которые постоянно секретируются лимфоцитами типа В-1 без предварительной внешней антигенной стимуляции [1, 2]. IgM NAb не только распознают патогены и участвуют в их выведении через активацию комплемента, но также играют важную роль в апоптотическом клиренсе клеток, гомеостазе тканей и модуляции иммунитета [3, 4]. Менее изучена роль естественных IgG антител, которые иногда считаются неспособными идентифицировать антигены и неактивными. Однако недавние исследования показали, что они взаимодействуют с лек-

тинами, участвуя в быстром и эффективном удалении патогенов, что позволяет предположить, что они могут быть частью моста между врожденным и приобретенным иммунитетом [5].

Широкий спектр NAb, направленных на углеводы (NAbC), может быть разделен на три различные группы: 1) консервативные NAbC, которые обладают практически одинаковой специфичностью и концентрацией в крови у всех здоровых людей; 2) аллоантитела к антигенам групп крови и ксеноантитела к антигенам других видов; 3) пластичные антитела, которые могут включать антитела из двух других групп, но чей уровень меняется при различных заболеваниях и временных состояниях, таких как воспаление или беременность [6]. Пластичные антитела также включают NAbC, реагирующие со связанными с опухолями углеводными антигенами, такими как Gal β 1-3GalNAc α (антиген Томсена–Фриденрайха) или GalNAc α (Tn-антиген). Эти антитела не являются специфическими для опухолей, но изменяются при раке или других заболеваниях [7]. Кроме того, они включают антитела, реагирующие на Gal α 1-3Gal β (α Gal) и особенно на Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β . На протяжении многих лет они считались самы-

Принятые сокращения: NAb – естественные антитела, NAbC – естественные антиуглеводные антитела, ТАА – связанные с опухолью антигены, ADE – антителозависимое усиление, Fab – антигенсвязывающий фрагмент, Fc – постоянный фрагмент, CDC – комплементзависимая цитотоксичность, ADCC – антителозависимая клеточная цитотоксичность, NARAb – гемолитические антисвиные антитела.

* Адресат для корреспонденции.

ми распространенными антителами в организме человека (до 2% от общего содержания иммуноглобулинов), но в недавних исследованиях их уровень был оценен только в 0,1%, что соответствует уровню многих других NAbC [6]. Эпитоп α Gal экспрессируется несколькими микроорганизмами, включая вирусы, бактерии и простейшие. На основании этого было сделано предположение, что постоянная продукция анти- α Gal антител у людей, приматов и обезьян Старого Света является результатом антигенной стимуляции обычной кишечной бактериальной флорой [8, 9]. У людей анти- α Gal антитела реагируют на эритроциты пациентов с β -талассемией или серповидно-клеточной анемией и на нормальные стареющие эритроциты [10]. Повышение уровня анти- α Gal антител описано для пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как базедова болезнь, болезни Шенлейн–Геноха и Крона [11]. Повышение уровня анти- α Gal антител также связано с более высокой смертностью пациентов, проходящих заместительную почечную терапию, и пациентов со связанным с перитонеальным диализом кишечным перитонитом [12].

К сожалению, изменения в анти- α Gal антителах и других NAbC обладают низкой чувствительностью и специфичностью для диагностики конкретных заболеваний и состояний. В ближайшем будущем ситуация может измениться благодаря существенному прогрессу, достигнутому в последние годы в области синтеза углеводов и технологии микрочипов. До настоящего времени NAbC в клинической практике распознают по нежелательной реакции на несовпадение групп крови при переливании крови или трансплантации органов, а также по отторжению ксенотрансплантатов, экспрессирующих α Gal-эпитопы. Эти клинические проявления не отражают биологической роли NAbC. Однако они позволяют предположить возможность использования NAbC для усиления иммунитета в различных клинических условиях путем: 1) экспрессии углеводных антигенов в элементах, где они отсутствуют, что позволит использовать связывание и реакционную способность существующих NAbC; 2) удаления существующих NAbC; 3) изменения рисунка гликозилирования NAbC.

УСИЛЕНИЕ ИММУНИТЕТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УГЛЕВОДНЫХ АНТИГЕНОВ

Не существует доказательств того, что кто-либо предпринимал попытки экспрессии АВО-несовместимых антигенов на клетках с целью

получения иммунологического ответа. Клинический интерес к этой углеводной реакции антиген–антитело связан с возможностью использовать манипулирование антителами для обеспечения переливания АВО-несовместимой крови или трансплантации несовместимых трансплантатов как целенаправленно, так и в тех случаях, когда это происходит случайно. Антигенными детерминантами групп крови А и В традиционно считаются GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal и Gal α 1-3(Fuc1-2)Gal соответственно. Однако недавно в качестве антигенов групп крови А и В были предложены GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc и Gal α 1-3(Fuc1-2)Gal β 1-4GlcNAc соответственно [13]. Антитела к группе крови А, которые обычно имеют низкую концентрацию, включают NAb к тетра- и трисахаридным фрагментам. Однако агрегацию эритроцитов могут вызывать только антитела к тетрасахаридной форме, поскольку трисахаридная встречается у людей как с группой крови А, так и В. Любопытно, что существенная доля антител, вырабатывающихся против несовместимых АВО-антигенов, состоит из анти- α Gal антител, которые взаимодействуют с α Gal-эпитопом в структуре Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β , являющейся внутренней (коровой) структурой в антигенах группы крови А и В [14]. Эти данные, а также классические представления о том, что анти- α Gal антитела представляют собой наиболее распространенную группу иммуноглобулинов человека, возможно, являются причиной того, что именно эпитоп α Gal рассматривается в качестве углеводного антигена-мишени при генерации иммунологического ответа на клиническом уровне.

Одним из первых возможных применений анти- α Gal антител является усиление иммунитета против клеток опухоли. Как мы описывали выше, NAbC включают пластические антитела, направленные на связанные с опухолью антигены (ТАА), которые не являются специфическими для опухолевых клеток, поскольку они могут встречаться и в здоровых тканях, хотя и в других концентрациях. В некоторых случаях можно вызвать иммунный ответ на ТАА, что связано с улучшением прогноза при раке [15]. Однако у большинства пациентов опухоль избегает этого иммунного ответа. Иммуногенность опухолей может быть увеличена вследствие экспрессии α Gal эпитопов после внутриопухолевой инъекции α Gal гликолипидов, как показано на α 1,3 галактозилтрансфераз-нокаутных (Gal-KO) мышцах [16]. Анти- α Gal антитела связывают α Gal на гликолипидах, активируя комплемент-опосредованную цитотоксичность и антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность против опухолевых клеток [16, 17]. Эта страте-

гия была оценена в клиническом исследовании фазы I, включавшем пациентов с раком на поздней стадии. Внутриопухолевая инъекция α Gal гликолипидов была безопасной и сопровождалась очевидным увеличением выживаемости у некоторых пациентов [18].

Другое возможное клиническое применение углеводных антигенов связано с усилением иммуногенности вакцин против инфекционных заболеваний. Синтетические олигосахариды β 1-6-D-глюкозамина и β 1-6-D-N-ацетилглюкозамина используются для производства конъюгатных вакцин, защищающих от широкого спектра патогенов. Многие бактерии продуцируют поверхностный полисахарид поли[β 1-6-N-ацетил-D-глюкозамин] (PNAG), и продукция антител к этому эпитопу может вызывать иммунный ответ на большое число микробов [19]. Кроме того, экспрессия α Gal эпитопов в инактивированной вакцине вируса гриппа и gp120 вакцине ВИЧ приводила к существенному увеличению гуморального и клеточного иммунного ответов, генерируемых этими вакцинами [20, 21]. Наночастицы, несущие α Gal-трансформированные антитела, вызывают более высокие иммунные ответы с более широким распознаванием эпитопов по сравнению с другими адъювантами [22]. Сочетание α Gal-модифицированных антигенов с технологией наночастиц может стать новаторским подходом к разработке следующего поколения вакцин против возникающих и повторно возникающих патогенов.

Анти- α Gal антитела также могут ускорять заживление ран и ожогов. Эта идея основана на местном привлечении и активации макрофагов для усиления регенерации поврежденной ткани. Местное применение липосом, несущих α Gal эпитопы, ускоряет процесс заживления ран и позволяет избежать фиброза и образования шрамов у Gal-KO мышей и свиней [23–25]. Способность восстанавливать и оживлять кожные раны, достигающаяся гликоконъюгатами α Gal, породила предложение использовать эти частицы для регенерации внутренних тканей, таких как миокард после инфаркта и поврежденные нервы [26].

ИСТОЩЕНИЕ АНТИУГЛЕВОДНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИММУНИТЕТА ПРОТИВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Антителозависимое усиление инфекции. Антитела играют ключевую роль в защите организма хозяина от инфекций. Однако существуют доказательства того, что при некоторых состояниях антитела могут усиливать инфекционный по-

тенциал микроорганизмов вместо того, чтобы защищать организм хозяина. Антителозависимое усиление (ADE) инфекции было изначально описано для вирусных заболеваний, особенно для вирусов из семейства *Flaviviridae* [27]. Например, тяжесть тропической лихорадки связана с присутствием материнских антител к вирусу Денге или предыдущим воздействием одного из четырех серотипов вируса Денге до начала вторичной инфекции. Аналогичным образом присутствие ненейтрализующих антител при ВИЧ не только не приводит к выработке защитного иммунного ответа, но и может усилить инфицирующую способность вируса [28]. Список вирусов человека и животных, которые могут воспользоваться ADE, довольно длинный и включает вирусы гриппа А, вирусы Коксаки, респираторно-синцитиальный вирус, вирус Эбола и др. [29]. ADE вирусной инфекции может наступать и после вакцинации, и индукция ненейтрализующих антител, похоже, является основной причиной невозможности разработки вакцин от некоторых вирусов, включая ВИЧ [30].

ADE может присутствовать и при развитии бактериальных инфекций. Специфический антителый ответ на поверхностные капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* или токсины *Bacillus anthracis* и *Staphylococcus aureus* может усиливать инфекцию, вызываемую этими бактериями [31]. Кроме того, естественные антитела к специфическим полисахаридам *S. aureus*, таким как поли-N-ацетилглюкозамин, мешают защитным антителам, индуцированным различными вакцинами против этого микроорганизма, приводя к невозможности иммунизации [32]. Случай анти- α Gal антител особенно парадоксален. Эти антитела, похоже, продуцируются в ответ на энтеробактерии кишечной микрофлоры [8]. В доказательство этой гипотезы мы продемонстрировали снижение анти- α Gal IgG антител после удаления этих микроорганизмов из кишечника приматов [9]. Однако также существуют доказательства того, что анти- α Gal антитела облегчают выживание Enterobacteriaceae или *Neisseria meningitidis*, усиливая их инфицирующую способность и заболевания, вызванные этими бактериями [33, 34].

С ADE при инфекциях, по всей видимости, связано несколько факторов. Они включают штамм микроорганизма и нагрузку, а также концентрацию, класс и специфичность антитела к эпитопу [29]. Для контроля биологической активности антител также важен комплемент, который, похоже, играет особую роль при ADE бактериальных инфекций. Для объяснения вредного воздействия анти- α Gal антител на инфекции, вызванные Enterobacteriaceae и *N. meningitidis*

gitidis, в качестве механизма была предложена дезактивация альтернативного пути активации комплемента [33, 34]. Неэффективность комплемент-опосредованного уничтожения бактерий может быть вызвана связыванием IgG2 антител с элементами О-связанных гликанов липополисахарида грамотрицательных бактерий. Этот тип ответа является причиной повышения тяжести заболевания легких, вызванных *Pseudomonas aeruginosa* у пациентов с бронхоэктазом [35]. Масштаб амплификации альтернативного пути активации комплемента, требуемой для оптимальной бактерицидной активности, зависит от степени активации классического пути активации комплемента, который, в свою очередь, зависит от экспрессии антигена [36]. Для эффективной активации комплемента антителами IgG2, которые являются основными IgG антителами в иммунитете против углеводных антигенов, также очень важна высокая плотность эпитопов. Соответственно, связывание IgG2 антител с углеводными антигенами низкой плотности может приводить к нарушению альтернативного пути активации комплемента. Удаление этих антител путем *in vitro* пассажа сыворотки через аффинную колонку, покрытую моноклональными анти-IgG2 антителами, восстанавливает активацию комплемента и бактерицидную активность сыворотки [35]. У нас также есть доказательства того, что такая стратегия эффективна *in vivo*. Истощение анти- α Gal антител, которое включает подкласс IgG2, предотвращает смертность в результате сепсиса при инфекциях *Escherichia coli* у Gal-KO мышей после лигирования и пункции прямой кишки (CLP) [37]. Таким образом, удаление существующих ненейтрализующих антиуглеводных антител может быть инновационным методом усиления иммунитета для профилактики или лечения инфекционных заболеваний. Потенциальный вклад этой стратегии может быть сопоставим с таковым для получения новых антител путем вакцинации.

Методы истощения антиуглеводных антител.

Для истощения антител в клинической и экспериментальной практике, как правило, используется метод экстракорпоральной абсорбции антител, полученных плазмаферезом, или абсорбции на колонке, несущей специфические антигены. Пациенты могут проходить эти процедуры ежедневно, что демонстрирует их безопасность. Однако для этого требуются высокотехнологичные приборы, из-за чего эти методы могут использоваться только в ограниченные периоды времени. Таким образом, более удачной стратегией удаления антител из кровотока, очевидно, является растворимый ингибитор, обладающий способностью к системному связыванию и вы-

воду антител. Такой ингибитор должен связываться с антителами как минимум столь же эффективно, как и естественные антигены; он должен быть неиммуногенным; образующиеся иммунные комплексы должны быстро выводиться из кровотока, чтобы избежать заболевания, связанных с отложением иммунных комплексов. Другой характеристикой, которую следует учитывать в конкретном случае антиуглеводных антител, является их высокий авидитет к поливалентным антигенам, гликопротеинам и гликолипидам в сочетании с низким сродством к индивидуальным олигосахаридам [38]. Поэтому для поливалентной презентации α Gal и максимизации авидитета к анти- α Gal антителам в качестве гибкого каркаса были выбраны полимеры [39]. Эти антитела многие годы оставались самым серьезным препятствием для пересадки трансплантатов свиней людям (ксеноантитела), требовавшим постоянного истощения, которого невозможно было добиться экстракорпоральной адсорбцией [40].

Максимальное увеличение авидитета анти- α Gal антител относительно мономера α Gal было достигнуто с помощью полимеров полиэтиленгликоля и линейного полилизинового каркаса со средней длиной 1000 остатков лизина и 25% боковых цепей, конъюгированных с α Gal трисахаридом (GAS 914, рис. 1) [41, 42]. Внутривенное или подкожное введение GAS914 приматам привело к быстрому и продолжительному удалению анти- α Gal антител из кровотока без активации комплемента и В-клеток (рис. 2). GAS914 накапливался в лимфоидных органах. Это может вызывать антигенспецифичную иммунологическую толерантность В-клеток и объяснять подавление анти- α Gal антител на период времени, намного превышающий период измеримого присутствия гликоконъюгатов в крови (рис. 2). Способность небольших доз GAS914 эффективно удалять анти- α Gal антитела наряду с возможностью его синтеза в больших количествах с ограниченной физико-химической вариабельностью дало надежду на его использование в качестве адекватного метода лечения при пересадке трансплантатов свиней (ксенотрансплантации). К сожалению, постоянное удаление анти- α Gal антител с помощью GAS91, а также использование органов от Gal-KO свиней, которые не экспрессируют α Gal, не может быть использовано в клинической практике. Причиной этого является наблюдавшееся у приматов отторжение ксенотрансплантатов, вызванное появлением антител, направленных на не- α Gal антигены [43, 44].

Доступность GAS914 позволила нам оценить влияние удаления анти- α Gal антител, вызванных кишечными бактериями *in vivo*, с получен-

ными выше положительными результатами. Усиление иммунитета, достигнутое путем истощения анти- α Gal антител, может найти применение в профилактике и лечении некоторых заболеваний. В их число входит большинство инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, которые в наши дни составляют большую часть случаев внутрибольничных инфек-

ций, включая множественные случаи заболеваний, вызванных микроорганизмами, устойчивыми к многочисленным антибиотикам и приводящими к таким серьезным заболеваниям, как сепсис. Тяжелые случаи сепсиса представляют собой распространенное, дорогостоящее и часто смертельное заболевание, на долю которого в год приходится столько же смертей, как

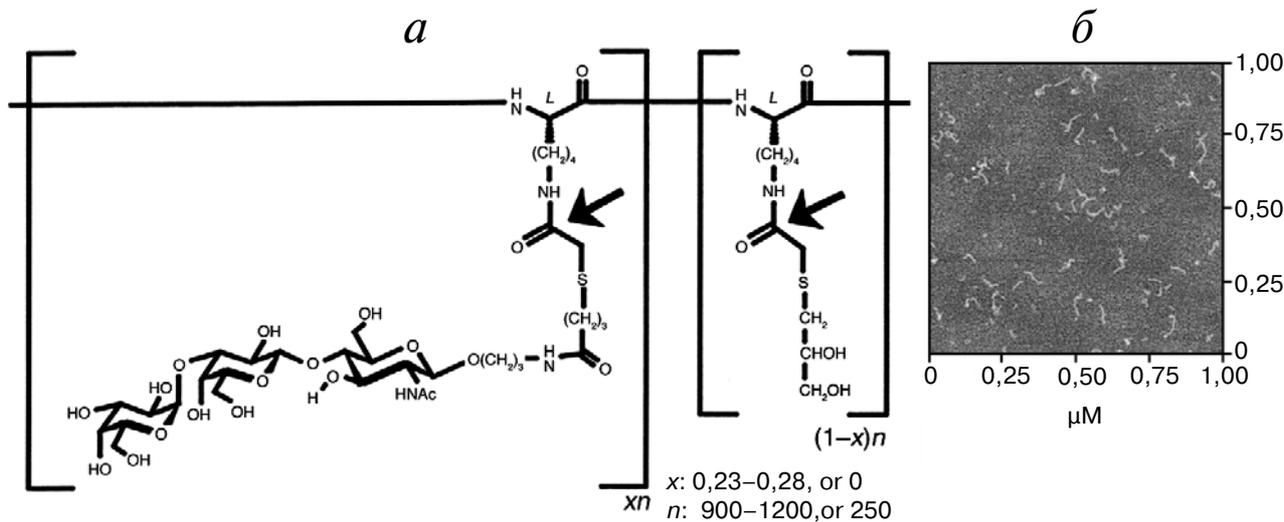


Рис. 1. Структура GAS 914 [42]. *а* – Химическая структура случайного сополимера, где n – средняя степень полимеризации, x – доля гликозилированного мономера, $(1-x)$ – доля мономера с тиоглицериновым заместителем. Стрелки указывают на положения, меченые ^{14}C , для фармакокинетических исследований; *б* – атомно-силовая микроскопия GAS914 демонстрирует цепочкоподобную молекулу со средним диаметром цепи $4,0 \pm 0,2$ и средней длиной цепи 79 ± 24 нм

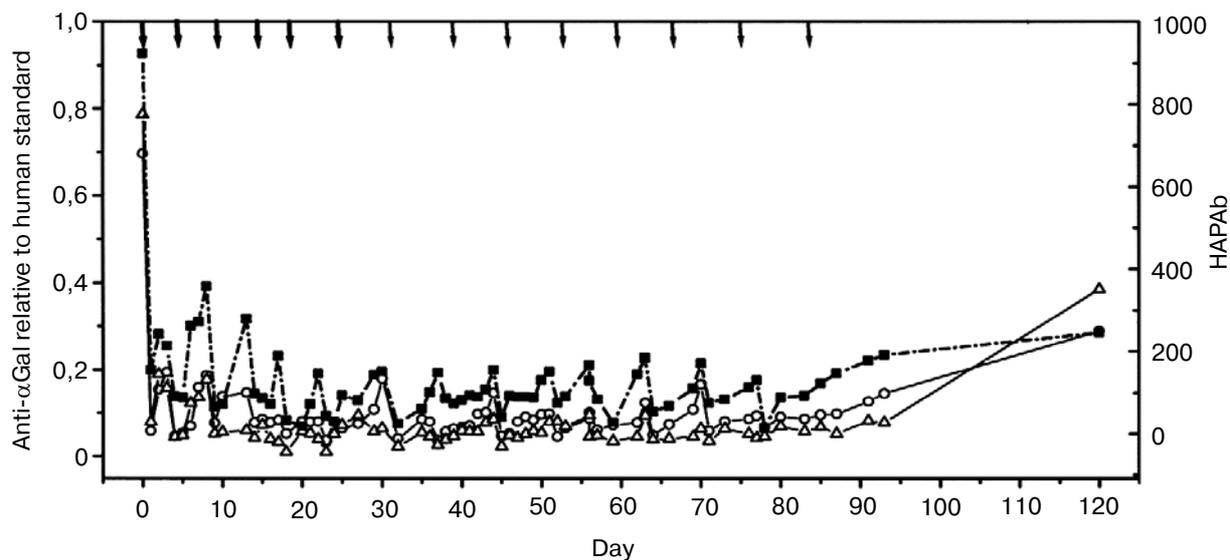


Рис. 2. Ингибирование α Gal IgG, IgM и гемолитических антисвиных антител (HAPAb) GAS914 [42]. Павианы получали внутривенные инъекции GAS914 в моменты времени, отмеченные стрелками. Жирные стрелки указывают на инъекции 5 мг/кг, тонкие стрелки – на инъекции 1 мг/кг. Титры анти- α Gal IgM (круги), IgG (треугольники) и HAPAb (квадраты) приведены относительно стандартной сыворотки человека (1 для анти- α Gal антител и 1000 для HAPAb)

на долю инфаркта миокарда [45]. Процент смертельных исходов зависит от внешних обстоятельств и тяжести заболевания, но может достигать до 30% в случае сепсиса, 50% – в случае тяжелого сепсиса и 80% – при септическом шоке. Если сепсис удастся идентифицировать и начать лечить на ранних стадиях, смертность может быть уменьшена, приводя к экономически эффективным преимуществам в виде увеличения продолжительности жизни/продолжительности жизни с поправкой на ее качество [46]. Благодаря α Gal-гликоконъюгатам, таким как GAS914 или его аналоги, мы впервые можем получить инструмент для профилактики сепсиса, болезни, от которой в настоящее время не существует специфического лечения. Наконец, α Gal-гликоконъюгаты могут также влиять на паразитарные инфекции, вызванные простейшими, такие как малярия и болезнь Чагаса. Оба заболевания связаны с усилением анти- α Gal антител, не позволяющих избежать перехода инфекции в хроническую фазу [47, 48].

Другой стратегией систематического удаления антиуглеводных антител могло бы стать внедрение синтетических гликолипидов на эритроциты (технология KODE), приводящее к образованию так называемых кодецитов [49]. Кодециты были изначально разработаны для создания системы контроля качества при переливании крови, идентификации и количественной оценки специальных антител или для более точного анализа антительного ответа через реакцию с клетками, экспрессирующими индивидуальные антигены [49]. Однако они также обладают потенциалом для использования в клинической практике при лечении людей для оценки выживаемости клеток [50] и для истощения антител к группам крови или любых других антител, направленных на углеводные антигены, которые могут быть конъюгированы с функционально-спейсерными липидами [51]. Несомненно, доступность методов систематического удаления антител с более приемлемым профилем токсичности у модельных животных может представлять собой существенный клинический прогресс в лечении заболеваний, связанных с избытком определенных антител (аутоиммунных заболеваний) или модуляции антителоопосредованного иммунного ответа.

МОДУЛЯЦИЯ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ АНТИТЕЛА

Гликозилирование антитела. Антитела представляют собой гликопротеины сыворотки крови, необходимые для гуморального иммунного

ответа. На основании своих тяжелых цепей они могут быть подразделены на пять основных классов: IgG, IgM, IgA, IgE и IgD [52, 53]. В сыворотке наиболее распространенным является класс IgG, на долю которого приходится 75% антител в кровотоке [54]. Этот иммуноглобулин также обладает самым длительным периодом полувыведения и может быть подразделен на четыре подкласса: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 [55, 56]. Следующими по распространенности иммуноглобулинами являются IgM и IgA (10 и 15% соответственно), период полувыведения которых в сыворотке существенно меньше [54, 57]. Ig состоят из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких полипептидных цепей (рис. 3). Каждая тяжелая цепь содержит один варибельный домен (VH) и три постоянных домена (CH1, CH2 и CH3). Кроме того, каждая легкая цепь содержит один варибельный домен (VL) и один постоянный домен (CL) [52, 58, 59]. Две тяжелые цепи связаны друг с другом и легкой цепью дисульфидными связями [60]. Получающаяся в результате тетрамерная четвертичная структура («Y»-форма) имеет три функциональные единицы: два антигенсвязывающих фрагмента (Fabs) и один постоянный фрагмент (Fc) [54, 61].

Имуноглобулины проявляют свои эффекторные функции (биологическую активность) через взаимодействие своей Fc-части с определенными целевыми молекулами и рецепторами [62, 63]. Гликозилирование Fc-области антител представляет собой высоковарибельный фермент-направленный сайтспецифический процесс, который происходит на стадии посттрансляционных изменений в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи в клетке [59, 63]. Область Fc IgG содержит один высококонсервативный N-связанный сайт гликозилирования при N297 (рис. 3) в CH2-домене каждой тяжелой цепи [64, 65]. N-связанные гликаны влияют на стерическое затруднение между двумя тяжелыми цепями, что позволяет удерживать IgG Fc в открытой конформации. Эти гликаны необходимы для инициации многих эффекторных функций IgG [54]. Удаление гликанов приводит к коллапсу тяжелых цепей [66], разрушающему связывание Fc-рецепторов и C1q [52, 54]. Кроме того, ~10–20% Fab имеют позиции N-гликозилирования в связывающей области [53].

Центральная (коровая) структура IgG Fc-гликанов включает остатки N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и маннозы (рис. 3). Она может быть удлинена путем присоединения терминальных и разветвляющихся остатков сахаров, таких как галактоза, сиаловая кислота, фукоза и разветвленный GlcNAc [53, 54]. Большинство гликанов

[68, 72–74]. Отсутствие галактозы на IgG также коррелирует с тяжестью некровоспаления печени и фиброза при хроническом гепатите В [69]. Удивительно, что присутствие или отсутствие одного концевых сахара в гликане Fc IgG может оказывать столь сильное влияние на эффекторные функции антитела. Поэтому возможность модулировать такое явление представляется очень привлекательным способом воздействия на эффекторные функции IgG.

Контроль гликозилирования антитела. Возможность гликозилирования определяется генетически, поэтому профиль гликанов зависит от хозяина. Структура полученных гликанов зависит от гликозилтрансфераз и модифицирующих ферментов, присутствующих в клетке. Рисунок гликозилирования IgG в сыворотке человека очень явно зависит от физиологического состояния отдельного человека [54]. Так, например, уровень галактозилированных и сиалилированных молекул IgG в сыворотке повышается во время беременности и снижается после родов [75]. Гликозилирование IgG также изменяется при некоторых состояниях. Как упоминалось выше, по сравнению со здоровыми людьми у людей с аутоиммунными и инфекционными заболеваниями наблюдается явное повышение дегалактозилированного и десиаилированного IgG в сыворотке. Однако как именно болезнь влияет на характер гликозилирования антигена, еще предстоит выяснить [54].

На настоящий момент мало что известно о факторах, которые могут регулировать состав Fc-связанных углеводных структур секретирующихся IgG во время активации и дифференциации В-лимфоцитов [62]. Предполагается, что регуляция экспрессии гликозилтрансфераз и гликозидаз, а также их активность в ответ на стимуляцию факторами внешней среды регулируются по-разному. Как факторы внешней среды, такие как политрансетриновая кислота, так и факторы, стимулирующие систему врожденного иммунитета (т.е. CpG олигодезоксинуклеотид, лиганд толл-подобного рецептора 9) или происходящие из системы адаптивного иммунитета (т.е. интерлейкин 21, полученный из Т-клеток цитокин), могут модулировать гликозилирование IgG1 Fc [62]. Есть несколько примеров того, как гликозилирование антитела было изменено для достижения лучшего иммунологического ответа на нарушения, такие как рак груди, толстой кишки и гематологический рак [76]. Среди антител IgG1 человека является основным изотипом, используемым в качестве терапевтического антитела, поскольку он обладает самым длинным периодом полувыведения в крови и наиболее сильными эффекторными

функциями (CDC, ADCC) по сравнению с антителами других классов и подклассов. Изменение рисунка гликозилирования этих антител может обладать большой терапевтической ценностью. Например, удаление α 1,6-фукозы с олигосахаридов, присоединенных к Asn297 IgG1 Fc человека, существенно увеличивает ADCC, приводя к более серьезному эффекту, чем любое другое структурное изменение в олигосахаридах Fc [77, 78]. После обнаружения усиления ADCC в результате дефукозилирования в клинические исследования были включены почти 20 гликоконструированных антител с такой модификацией [76].

Другой возможный способ модуляции гликозилирования антител включает контроль внеклеточных метаболитов (в основном гликанов) и ферментов, связанных с их синтезом, транспортом и реакцией гликозилирования в целом. N-гликозилирование антител начинается на эндоплазматическом ретикулуме. Затем гликопротеин переносится в аппарат Гольджи, где высокоманнозные гликаны перерабатываются ферментами с образованием большого числа вариантов гликоформ в зависимости от клеточной линии хозяина [79]. Местная специфическая активность ферментов и доступность субстратов реакции, таких как нуклеотидные доноры сахарных остатков (NSD) [80], являются ключевыми элементами, определяющими тип и степень гликозилирования антитела. NSD синтезируются в цитоплазме клеток и затем переносятся в Гольджи. На их синтез большое влияние оказывает присутствие ключевых питательных веществ во время выращивания культуры [81, 82], таких как глюкоза и галактоза. Добавление специфических метаболитов-посредников путей нуклеотидного синтеза сахаров к культуре сдвигает направление метаболизма в сторону желаемого нуклеотид-сахара [83, 84]. Это позволяет предложить новый подход к конструированию гликоформ путем добавления определенных компонентов в среду [79, 85]. Например, влияние добавки прекурсора нуклеотид-сахара на активность внутриклеточного гликозилирования было изучено на CHO-клетках, продуцирующих рекомбинантный интерферон гамма человека (IFN- γ) [86]. Добавление галактозы (+/–уридин), глюкозамина (+/–уридин) и N-ацетилманнозамина (ManNAc) (+/–цитидин) приводило к 12-, 28- и 32%-ному повышению сиалилирования IFN- γ по сравнению с контрольными культурами, не получавшими добавки. Это может быть напрямую связано с повышением доли субстратов нуклеотид-сахара UDP-Hex (приблизительно в 20 раз), UDP-HexNAc (от 6 до 15 раз) и CMP-сиаловой кислоты (30–120

раз) соответственно [86]. Недавно была разработана модельная конструкция, объясняющая связь между внеклеточной средой и ее влиянием на внутриклеточные метаболиты и распределением гликанов на постоянном домене антительного продукта. Внимание в этом исследовании было в основном сосредоточено на механической *in silico* реконструкции метаболической сети нуклеотидных доноров сахаров. В результате была создана модельная платформа, способная описывать гликоформу продукта на основании условий внешней среды [80].

В заключение, неферментное гликозилирование белков плазмы, включая Ig, было описано для пациентов с диабетом и связано с описанным для этих пациентов нарушением иммунореактивности [87]. Неферментное гликозилирование IgG наблюдалось тогда, когда внеклеточная концентрация глюкозы-фруктозы была повышена, что позволяет предположить, что воздействие других углеводов также может приводить к новым изменениям в гликозилировании. Таким образом, мы утверждаем, что после уда-

ления анти- α Gal антител продолжающееся воздействие α Gal через гликоконъюгаты может представлять собой инструмент для модификации гликозилирования IgG. Воздействие α Gal гликоконъюгатов может быть особенно эффективным при патологических состояниях, связанных с повышением содержания дегалактозилированных IgG антител, наблюдающихся, например, при аутоиммунных и инфекционных заболеваниях. Наряду с экспрессией новых углеводных антигенов или удалением ненейтрализующих антиуглеводных антител этот подход может обладать новыми терапевтическими применениями при широком ряде нарушений.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) PI10/01727 и PI13/01098 Института здравоохранения им. Карлоса III, Министерства здравоохранения Испании и гранта HEALTH-F4-2013-603049 TransLink Collaborative Project от European Commission's Seventh Framework Programme.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schwartz-Albiez, R., Monteiro, R.C., Rodriguez, M., Binder, C.J., and Shoenfeld, Y. (2009) Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation, *Clin. Exp. Immunol.*, **158** (Suppl. 1), 43–50.
- Holodick, N.E., Tumang, J.R., and Rothstein, T.L. (2010) Immunoglobulin secretion by B1 cells: differential intensity and IRF4-dependence of spontaneous IgM secretion by peritoneal and splenic B1 cells, *Eur. J. Immunol.*, **40**, 3007–3016.
- Sorman, A., Zhang, L., Ding, Z., and Heyman, B. (2014) How antibodies use complement to regulate antibody responses, *Mol. Immunol.*, **61**, 79–88.
- Gronwall, C., and Silverman, G.J. (2014) Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease, *J. Clin. Immunol.*, **34** (Suppl. 1), 12–21.
- Panda, S., and Ding, J.L. (2015) Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity, *J. Immunol.*, **194**, 13–20.
- Bovin, N.V. (2013) Natural antibodies to glycans, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 786–797.
- Bovin, N., Obukhova, P., Shilova, N., Rapoport, E., Popova, I., Navakouski, M., Unverzagt, C., Vuskovic, M., and Huflejt, M. (2012) Repertoire of human natural anti-glycan immunoglobulins. Do we have auto-antibodies? *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 1373–1383.
- Galili, U., Mandrell, R.E., Hamadeh, R.M., Shohet, S.B., and Griffis, J.M. (1988) Interaction between human natural anti- α -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora, *Infect. Immun.*, **56**, 1730–1737.
- Manez, R., Blanco, F.J., Diaz, I., Centeno, A., Lopez-Pelaez, E., Hermida, M., Davies, H.F., and Katopodis, A. (2001) Removal of bowel aerobic gram-negative bacteria is more effective than immunosuppression with cyclophosphamide and steroids to decrease natural alpha-galactosyl IgG antibodies, *Xenotransplantation*, **8**, 15–23.
- Galili, U., Korkesh, A., Kahane, I., and Rachmilewitz, E.A. (1983) Demonstration of a natural antigalactosyl IgG antibody on thalassemic red blood cells, *Blood*, **61**, 1258–1264.
- D'Alessandro, M., Mariani, P., Lomanto, D., Bachetoni, A., and Speranza, V. (2002) Alterations in serum anti- α -galactosyl antibodies in patients with Crohn's and ulcerative colitis, *Clin. Immunol.*, **103**, 63–68.
- Fontan, M.P., Manez, R., Rodriguez-Carmona, A., Peteiro, J., Martinez, V., Garcia-Falcon, T., and Domenech, N. (2006) Serum levels of anti-alpha galactosyl antibodies predict survival and peritoneal dialysis-related enteric peritonitis rates in patients undergoing renal replacement therapy, *Am. J. Kidney Dis.*, **48**, 972–982.
- Obukhova, P., Korchagina, E., Henry, S., and Bovin, N. (2011) Natural anti-A and anti-B of the ABO system: allo- and autoantibodies have different epitope specificity, *Transfusion*, **52**, 860–869.
- Galili, U., Ishida, H., Tanabe, K., and Toma, H. (2002) Anti-gal A/B, a novel anti-blood group antibody identified in recipients of abo-incompatible kidney allografts, *Transplantation*, **74**, 1574–1580.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., and Pages, F. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome, *Science*, **313**, 1960–1964.
- Galili, U., Wigglesworth, K., and Abdel-Motal, U.M. (2007) Intratumoral injection of α -gal glycolipids induces xenograft-like destruction and conversion of lesions into endogenous vaccines, *J. Immunol.*, **178**, 4676–4687.
- Galili, U., Albertini, M.R., Sondel, P.M., Wigglesworth, K., Sullivan, M., and Whalen, G.F. (2010) *In situ* conver-

- sion of melanoma lesions into autologous vaccine by intratumoral injections of α -gal glycolipids, *Cancers*, **2**, 773–793.
18. Whalen, G.F., Sullivan, M., Piperdi, B., Wasseff, W., and Galili, U. (2012) Cancer immunotherapy by intratumoral injection of α -gal glycolipids, *Anticancer Res.*, **32**, 3861–3868.
 19. Gening, M.L., Maira-Litran, T., Kropec, A., Skurnik, D., Grout, M., Tsvetkov, Y.E., Nifantiev, N.E., and Pier, G.B. (2010) Synthetic β -(1→6)-linked N-acetylated and nonacetylated oligoglucosamines used to produce conjugate vaccines for bacterial pathogens, *Infect. Immun.*, **78**, 764–772.
 20. Abdel-Motal, U.M., Guay, H.M., Wigglesworth, K., Welsh, R.M., and Galili, U. (2007) Immunogenicity of influenza virus vaccine is increased by anti-gal-mediated targeting to antigen-presenting cells, *J. Virol.*, **81**, 9131–9141.
 21. Abdel-Motal, U., Wang, S., Lu, S., Wigglesworth, K., and Galili, U. (2006) Increased immunogenicity of human immunodeficiency virus gp120 engineered to express Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R epitopes, *J. Virol.*, **80**, 6943–6951.
 22. Phanse, Y., Carrillo-Conde, B.R., Ramer-Tait, A.E., Broderick, S., Kong, C.S., Rajan, K., Flick, R., Mandell, R.B., Narasimhan, B., and Wannemuehler, M.J. (2014) A systems approach to designing next generation vaccines: combining α -galactose modified antigens with nanoparticle platforms, *Sci. Rep.*, **4**, 3775.
 23. Wigglesworth, K.M., Racki, W.J., Mishra, R., Szomolanyi-Tsuda, E., Greiner, D.L., and Galili, U. (2011) Rapid recruitment and activation of macrophages by anti-Gal/ α -Gal liposome interaction accelerates wound healing, *J. Immunol.*, **186**, 4422–4432.
 24. Galili, U., Wigglesworth, K., and Abdel-Motal, U.M. (2010) Accelerated healing of skin burns by anti-Gal/ α -gal liposomes interaction, *Burns*, **36**, 239–251.
 25. Hurwitz, Z.M., Ignatz, R., Lalikos, J.F., and Galili, U. (2012) Accelerated porcine wound healing after treatment with α -gal nanoparticles, *Plast. Reconstr. Surg.*, **129**, 242–251.
 26. Galili, U. (2013) Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogenesis and clinical benefits, *Immunology*, **140**, 1–11.
 27. Ubol, S., Phuklia, W., Kalayanaroj, S., and Modhiran, N. (2010) Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies, *J. Infect. Dis.*, **201**, 923–935.
 28. Willey, S., Aasa-Chapman, M.M., O'Farrell, S., Pellegrino, P., Williams, I., Weiss, R.A., and Neil, S.J. (2011) Extensive complement-dependent enhancement of HIV-1 by autologous non-neutralising antibodies at early stages of infection, *Retrovirology*, **8**, 16.
 29. Takada, A., and Kawaoka, Y. (2003) Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and *in vivo* implications, *Rev. Med. Virol.*, **13**, 387–398.
 30. Huisman, W., Martina, B.E., Rimmelzwaan, G.F., Gruters, R.A., and Osterhaus, A.D. (2009) Vaccine-induced enhancement of viral infections, *Vaccine*, **27**, 505–512.
 31. Mahalingam, S., and Lidbury, B.A. (2003) Antibody-dependent enhancement of infection: bacteria do it too, *Trends Immunol.*, **24**, 465–467.
 32. Skurnik, D., Kropec, A., Roux, D., Theilacker, C., Huebner, J., and Pier, G.B. (2012) Natural antibodies in normal human serum inhibit *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide vaccine efficacy, *Clin. Infect. Dis.*, **55**, 1188–1197.
 33. Hamadeh, R.M., Jarvis, G.A., Galili, U., Mandrell, R.E., Zhou, P., and Griffiths, J.M. (1992) Human natural anti-Gal IgG regulates alternative complement pathway activation on bacterial surfaces, *J. Clin. Invest.*, **89**, 1223–1235.
 34. Hamadeh, R.M., Estabrook, M.M., Zhou, P., Jarvis, G.A., and Griffiths, J.M. (1995) Anti-gal binds to pili of *Neisseria meningitidis*: the immunoglobulin A isotype blocks complement-mediated killing, *Infect. Immun.*, **63**, 4900–4906.
 35. Wells, T.J., Whitters, D., Sevastyanovich, Y.R., Heath, J.N., Pravin, J., Goodall, M., Browning, D.F., O'Shea, M.K., Cranston, A., De Soyza, A., Cunningham, A.F., MacLennan, C.A., Henderson, I.R., and Stockley, R.A. (2014) Increased severity of respiratory infections associated with elevated anti-LPS IgG2 which inhibits serum bactericidal killing, *J. Exp. Med.*, **211**, 1893–1904.
 36. Giuntini, S., Reason, D.C., and Granoff, D.M. (2012) Combined roles of human IgG subclass, alternative complement pathway activation, and epitope density in the bactericidal activity of antibodies to meningococcal factor H binding protein, *Infect. Immun.*, **80**, 187–194.
 37. Manez, R., Perez-Cruz, M., Bello, D., Dominguez, M.A., and Costa, C. (2014) Removal of natural anti-galactose α 1,3 galactose antibodies with GAS914 enhances humoral immunity and prevents sepsis mortality in mice, *Int. Care Med. Exper.*, **2** (Suppl. 1), 50.
 38. Galili, U., and Matta, K.L. (1996) Inhibition of anti-Gal IgG binding to porcine endothelial cells by synthetic oligosaccharides, *Transplantation*, **62**, 256–262.
 39. Byrne, G.W., Schwarz, A., Fesi, J.R., Birch, P., Nepomich, A., Bakaj, I., Velardo, M.A., Jiang, C., Manzi, A., Dintzis, H., Diamond, L.E., and Logan, J.S. (2002) Evaluation of different alpha-galactosyl glycoconjugates for use in xenotransplantation, *Bioconj. Chem.*, **13**, 571–581.
 40. Manez, R., Domenech, N., Centeno, A., Lopez-Pelaez, E., Crespo, F., Juffe, A., Duthaler, R.O., and Katopodis, A.G. (2004) Failure to deplete anti-Gal α 1-3Gal antibodies after pig-to-baboon organ xenotransplantation by immunoaffinity columns containing multiple Gal α 1-3Gal oligosaccharides, *Xenotransplantation*, **11**, 408–415.
 41. Diamond, L.E., Byrne, G.W., Schwarz, A., Davis, T.A., Adams, D.H., and Logan, J.S. (2002) Analysis of the control of the anti-gal immune response in a non-human primate by galactose α 1-3 galactose trisaccharide-polyethylene glycol conjugate, *Transplantation*, **73**, 1780–1787.
 42. Katopodis, A.G., Warner, R.G., Duthaler, R.O., Streiff, M.B., Bruelisauer, A., Kretz, O., Dorobek, B., Persohn, E., Andres, H., Schweitzer, A., Thoma, G., Kinzy, W., Quesniaux, V.F., Cozzi, E., Davies, H.F., Manez, R., and White, D. (2002) Removal of anti-Gal α 1,3Gal xenoantibodies with an injectable polymer, *J. Clin. Invest.*, **110**, 1869–1877.
 43. Lam, T.T., Paniagua, R., Shivaram, G., Schuurman, H.J., Borie, D.C., and Morris, R.E. (2004) Anti-non-Gal porcine endothelial cell antibodies in acute humoral xenograft rejection of hDAF-transgenic porcine hearts in cynomolgus monkeys, *Xenotransplantation*, **11**, 531–535.
 44. Chen, G., Qian, H., Starzl, T., Sun, H., Garcia, B., Wang, X., Wise, Y., Liu, Y., Xiang, Y., Copeman, L., Liu, W., Jevnikar, A., Wall, W., Cooper, D.K., Murase, N., Dai, Y., Wang, W., Xiong, Y., White, D.J., and Zhong, R. (2005) Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys, *Nature Med.*, **11**, 1295–1298.
 45. Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M.R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care, *Crit. Care Med.*, **29**, 1303–1310.
 46. McPherson, D., Griffiths, C., Williams, M., Baker, A., Klodawski, E., Jacobson, B., and Donaldson, L. (2013)

- Sepsis-associated mortality in England: an analysis of multiple cause of death data from 2001 to 2010, *BMJ Open*, **3**, e002586.
47. Almeida, I.C., Milani, S.R., Gorin, P.A., and Travassos, L.R. (1991) Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies, *J. Immunol.*, **146**, 2394–2400.
 48. Yilmaz, B., Portugal, S., Tran, T.M., Gozzelino, R., Ramos, S., Gomes, J., Regalado, A., Cowan, P.J., d'Apice, A.J., Chong, A.S., Doumbo, O.K., Traore, B., Crompton, P.D., Silveira, H., and Soares, M.P. (2014) Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission, *Cell*, **159**, 1277–1289.
 49. Frame, T., Carroll, T., Korchagina, E., Bovin, N., and Henry, S. (2006) Synthetic glycolipid modification of red blood cell membranes, *Transfusion*, **47**, 876–882.
 50. Oliver, C., Blake, D., and Henry, S. (2011) Modeling transfusion reactions and predicting *in vivo* cell survival with kocytes, *Transfusion*, **51**, 1723–1730.
 51. Oliver, C., Blake, D., and Henry, S. (2011) *In vivo* neutralization of anti-A and successful transfusion of A antigen-incompatible red blood cells in an animal model, *Transfusion*, **51**, 2664–2675.
 52. Jefferis, R. (1991) Structure–function relationships in human immunoglobulins, *Neth. J. Med.*, **39**, 188–198.
 53. Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, *Front. Immunol.*, **5**, 520.
 54. Shade, K.T., and Anthony, R.M. (2013) Antibody glycosylation and inflammation, *Antibodies*, **2**, 392–414.
 55. Schur, P.H. (1988) IgG subclasses. A historical perspective, *Monogr. Allergy*, **23**, 1–11.
 56. Rispen, T., Davies, A.M., Ooijevaar-de Heer, P., Absalah, S., Bende, O., Sutton, B.J., Vidarsson, G., and Aalberse, R.C. (2014) Dynamics of inter-heavy chain interactions in human immunoglobulin G (IgG) subclasses studied by kinetic Fab arm exchange, *J. Biol. Chem.*, **289**, 6098–6109.
 57. Schroeder, H.W., Jr., and Cavacini, L. (2010) Structure and function of immunoglobulins, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, 41–52.
 58. Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Gall, W.E., Gottlieb, P.D., Rutishauser, U., and Waxdal, M.J. (1969) The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 78–85.
 59. Hristodorov, D., Fischer, R., and Linden, L. (2013) With or without sugar? (A)glycosylation of therapeutic antibodies, *Mol. Biotechnol.*, **54**, 1056–1068.
 60. Grossberg, A.L., Stelos, P., and Pressman, D. (1962) Structure of fragments of antibody molecules as revealed by reduction of exposed disulfide bonds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 1203–1209.
 61. Huber, R. (1980) Spatial structure of immunoglobulin molecules, *Klin. Wochenschr.*, **58**, 1217–1231.
 62. Wang, J., Balog, C.I., Stavenhagen, K., Koeleman, C.A., Scherer, H.U., Selman, M.H., Deelder, A.M., Huizinga, T.W., Toes, R.E., and Wuhler, M. (2011) Fc-glycosylation of IgG1 is modulated by B-cell stimuli, *Mol. Cell Proteomics*, **10**, M110.004655.
 63. Hmiel, L.K., Brorson, K.A., and Boyne, M.T. (2015) Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 79–94.
 64. Nimmerjahn, F., Anthony, R.M., and Ravetch, J.V. (2007) Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for *in vivo* activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8433–8437.
 65. Abes, R., and Teillaud, J.L. (2010) Glycosylation on effector functions of therapeutic IgG, *Pharmaceuticals*, **3**, 146–157.
 66. Feige, M.J., Nath, S., Catharino, S.R., Weinfurter, D., Steinbacher, S., and Buchner, J. (2009) Structure of the murine unglycosylated IgG1 Fc fragment, *J. Mol. Biol.*, **391**, 599–608.
 67. Zauner, G., Selman, M.H.J., Bondt, A., Rombouts, Y., Blank, D., Deelder, A.M., and Wuhler, M. (2013) Glyco-proteomic analysis of antibodies, *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 856–865.
 68. Lamontagne, A., Long, R.E., Comunale, M.A., Hafner, J., Rodemich-Betesh, L., Wang, M., Marrero, J., Di Bisceglie, A.M., Block, T., and Mehta, A. (2013) Altered functionality of anti-bacterial antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection, *PLoS One*, **8**, e64992.
 69. Ho, C.H., Chien, R.N., Cheng, P.N., Liu, J.H., Liu, C.K., Su, C.S., Wu, I.C., Li, I.C., Tsai, H.W., Wu, S.L., Liu, W.C., Chen, S.H., and Chang, T.T. (2015) Aberrant serum immunoglobulin G glycosylation in chronic hepatitis B is associated with histological liver damage and reversible by antiviral therapy, *J. Infect. Dis.*, **211**, 115–124.
 70. Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006) Antiinflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation, *Science*, **313**, 670–673.
 71. Malhotra, R., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Fischer, P.B., Dwek, R.A., and Sim, R.B. (1995) Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein, *Nature Med.*, **1**, 237–243.
 72. Moore, J.S., Wu, X., Kulhavy, R., Tomana, M., Novak, J., Moldoveanu, Z., Brown, R., Goepfert, P.A., and Mestecky, J. (2005) Increased levels of galactose-deficient IgG in sera of HIV-1-infected individuals, *AIDS*, **19**, 381–389.
 73. Ackerman, M.E., Crispin, M., Yu, X., Baruah, K., Boesch, A.W., Harvey, D.J., Dugast, A.S., Heizen, E.L., Ercan, A., Choi, I., Streeck, H., Nigrovic, P.A., Bailey-Kellogg, C., Scanlan, C., and Alter, G. (2013) Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity, *J. Clin. Invest.*, **123**, 2183–2192.
 74. Mehta, A.S., Long, R.E., Comunale, M.A., Wang, M., Rodemich, L., Krakover, J., Philip, R., Marrero, J.A., Dwek, R.A., and Block, T.M. (2008) Increased levels of galactose-deficient anti-Gal immunoglobulin G in the sera of hepatitis C virus-infected individuals with fibrosis and cirrhosis, *J. Virol.*, **82**, 1259–1270.
 75. van de Geijn, F.E., Wuhler, M., Selman, M.H., Willemsen, S.P., de Man, Y.A., Deelder, A.M., Hazes, J.M., and Dolhain, R.J. (2009) Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study, *Arthritis Res. Ther.*, **11**, R193.
 76. Niwa, R., and Satoh, M. (2015) The current status and prospects of antibody engineering for therapeutic use: focus on glycoengineering technology, *J. Pharm. Sci.*, **104**, 930–941.
 77. Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H., and Presta, L.G. (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody dependent cellular cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 26733–26740.
 78. Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., and Shitara, K. (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, **278**, 3466–3473.
 79. Jedrzejewski, P.M., del Val, I.J., Constantinou, A., Dell, A., Haslam, S.M., Polizzi, K.M., and Kontoravdi, C.

- (2014) Towards controlling the glycoform: a model framework linking extracellular metabolites to antibody glycosylation, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 4492–4522.
80. Del Val, I.J., Kontoravdi, C., and Nagy, J.M. (2010) Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns, *Biotechnol. Progr.*, **26**, 1505–1527.
81. Murrell, M.P., Yarema, K.J., and Levchenko, A. (2004) The systems biology of glycosylation, *ChemBiochem*, **5**, 1334–1347.
82. Sou, S.N., Sellick, C., Lee, K., Mason, A., Kyriakopoulos, S., Polizzi, K.M., and Kontoravdi, C. (2014) How does mild hypothermia affect monoclonal antibody glycosylation? *Biotechnol. Bioeng.* DOI: 10.1002/bit.25524.
83. Hills, A.E., Patel, A., Boyd, P., and James, D.C. (2001) Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **75**, 239–251.
84. Grainger, R.K., and James, D.C. (2013) CHO cell line specific prediction and control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation, *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 2970–2983.
85. Jedrzejewski, P.M., del Val, I.J., Polizzi, K.M., and Kontoravdi, C. (2013) Applying quality by design to glycoprotein therapeutics: experimental and computational efforts of process control, *Pharm. Bioprocess*, **1**, 51–69.
86. Wong, N.S., Wati, L., Nissom, P.M., Feng, H.T., Lee, M.M., and Yap, M.G. (2010) An investigation of intracellular glycosylation activities in CHO cells: effects of nucleotide sugar precursor feeding, *Biotechnol. Bioeng.*, **107**, 321–336.
87. Kalia, K., Sharma, S., and Mistry, K. (2004) Non-enzymatic glycosylation of immunoglobulins in diabetic nephropathy, *Clin. Chim. Acta*, **347**, 169–176.

EXPLOITING NATURAL ANTI-CARBOHYDRATE ANTIBODIES FOR THERAPEUTIC PURPOSES

D. Bello-Gil¹, R. Manez^{1,2*}

¹ Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL),
Gran Via de l'Hospitalet, 199 08908 Hospitalet de Llobregat, Spain

² Bellvitge University Hospital, Feixa Llarga s/n 08907,
Hospitalet de Llobregat, Spain; E-mail: rmanez@bellvitgehospital.cat

Received March 4, 2015

Revision received April 13, 2015

Natural anti-carbohydrate antibodies (NAbC) are antibodies targeting glycans continuously produced without clear external antigen stimulation. Clinically, NAbC are recognized by the adverse reactions to ABO-mismatched blood transfusions or organ transplantation and the rejection of xenografts. These clinical effects do not reflect the biological functions of NAbC, but launch the possibility of using these antibodies for boosting immunity in different clinical settings. This could be achieved in three forms that are reviewed here: 1) via the expression of carbohydrate antigens in elements lacking them to allow the reactivity of existing NAbC; 2) by removal of existing NAbC; 3) through change in glycosylation of NAbC.

Key words: natural antibodies, anti-carbohydrate antibodies, anti-blood group antibodies, anti-galactose α 1,3 galactose antibodies