

НЕОГЛИКОЛИПИДЫ КАК ИНСТРУМЕНТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГЛИКОБИОЛОГИИ И ГЛИКОМЕДИЦИНЕ

Обзор

© 2015 Е.Ю. Корчагина¹, С.М. Генри^{2*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10; факс: +7(495)330-5592,
электронная почта: korchagina@carb.ibch.ru, elyu@yandex.ru

² Технологический университет Окленда, факультет дизайна
и современных технологий, Центр инновационных технологий
KODE AUT, инженерное отделение, Прайвит Бэг 92006, Окленд,
1142, Новая Зеландия; электронная почта: shenry@aut.ac.nz

Поступила в редакцию 24.03.15
После доработки 14.04.15

Конструкции из функциональных липидов со спейсерной группой (function spacer lipid, FSL) представляют собой диспергируемые в воде амфифильные молекулы, способные самоассоциировать в клеточных мембранах или на твердых поверхностях. Модификация биологической или небиологической поверхности происходит быстро и достигается путем простого контакта поверхности с соответствующим буферным раствором, содержащим один или несколько видов FSL. Если функциональная концевая группа FSL является гликаном, формируются гликан-модифицированные поверхности. FSL-модифицированные клетки, вирусы и поверхности использовались как инструменты исследования *in vitro* и/или *in vivo*, в частности для исследования антител и лектинов. FSL нашли применение для картирования специфичности антител и нейтрализации антител/токсинов, а также в диагностических системах. FSL-модифицированные клетки использовались для иммунокорректировки и изучения трансфузионных реакций *in vivo* на моделях животных. FSL являются самым простым и быстрым методом модификации поверхности гликанами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: функциональные липиды со спейсерной группой, технология KODE, кодециты, неогликолипиды.

Гликаны поверхности клеток существуют преимущественно в трех формах: ассоциированные с поверхностью незаякоренные гликоконъюгаты, заякоренные в мембране гликопротеины (неподвижные гликаны) и мобильные мембраносвязанные гликаны, такие как гликолипиды и GPI-связанные белки. Некоторые гликаны, ассоциированные с мембраной, могут одновременно присутствовать во всех трех формах, например, антигены групп крови могут

входить в состав муцинов, адгезированных на поверхности плазматической мембраны, а также присутствовать в мембране в составе заякоренных гликопротеинов и подвижных гликолипидов. Несмотря на то, что все типы ассоциированных с клеткой гликанов интересны с точки зрения проявления ими биологических функций [1, 2], данный обзор сфокусирован на синтезе и биологической активности только мобильных мембраносвязанных гликанов в форме синтетических гликолипидоподобных конструкций (неогликолипидов, NGL или функциональных липидов со спейсерной группой, FSL).

Липидный «хвост» природного гликолипида обеспечивает ассоциацию гликана с клеткой – погружаясь внутрь, он заякоривает гликан в плазматической мембране [3, 4]. Такие молекулы либо распределяются равномерно, либо образуют кластеры, при этом ассоциируя с другими компонентами мембраны [5, 6]. Встроенные

Принятые сокращения: FSL – функциональный липид со спейсерной группой; NGL – неогликолипид; SMG – карбоксиметилглициновая спейсерная группа; DOPE – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; HA – гиалуроновая кислота; F – функциональная концевая группа (функциональная «голова»); L – липидный «хвост»; S – спейсерная группа; ТСХ – тонкослойная хроматография; ИФА – иммуноферментный анализ. Сокращения гликанов приведены в табл. 1.

* Адресат для корреспонденции.

гликолипиды имеют определенное время жизни в плазматической мембране — выходят в межклеточный матрикс (или в плазму крови); обратное явление тоже имеет место, т.е. неогликолипиды могут быть захвачены из межклеточных жидкостей в плазматическую мембрану [3, 4]. Именно независимая («free-spirit») природа гликолипидов сделала их идеальной моделью для разработки синтетических гликолипидоподобных конструкций для модификации клеток гликанами. В настоящее время используется несколько методов получения неогликолипидов. Одним из них является конъюгация восстанавливающих олигосахаридов с аминофосфолипидами посредством восстановительного аминирования [7, 8]. Данная методология включает раскрытие моносахаридного кольца на восстанавливаемом конце, что в ряде случаев оказывает влияние на биологическую активность гликанов. Другим подходом к синтезу NGL является оксимное лигирование, которое заключается в конденсации восстанавливающих олигосахаридов с липидами, содержащими аминоксифункциональную группу [9]. В составе полученных таким образом неогликолипидов обычно присутствуют как циклическая, так и ациклическая формы моносахарида на восстанавливаемом конце, что приводит к неопределенности структуры NGL и химической нестабильности по отношению к гидролизу. Тем не менее такие NGL применяются в микроэррейнных системах для идентификации новых биологически значимых гликолигандов [8, 9]. Идентичные природным синтетические гликофинголипиды получают в результате многостадийного химического синтеза, они нашли применение для исследования углевод-углеводного и углевод-белкового взаимодействия в клеточной адгезии, при бактериальных и вирусных инфекциях, в воспалительном ответе и т.д. [10, 11]. Основным их недостатком является сложность конъюгации гликана с керамидным остатком. Сообщалось также о синтезе неогликолипидов, содержащих стерол, сдвоенные алкильные цепи или остатки высших спиртов в качестве липидоподобного агликона [12–14]. Однако такие NGL часто плохо растворяются в физиологическом растворе и требуют добавления растворителей (например, метанола) и/или других липидов для солубилизации перед встраиванием в мембрану [12].

Для преодоления вышеупомянутых ограничений мы разработали подход к созданию растворимых в воде неогликолипидов посредством присоединения гликанов к липидам через спейсерные группы — так называемых FSL-конструктов [15]. При разработке FSL мы руководствовались и другими критериями: FSL должны спон-

танно и воспроизводимо встраиваться в клеточные мембраны, а спейсерная группа и липид *per se* должны быть биологически инертными, чтобы обеспечить возможность использования FSL *in vivo*. Позднее было обнаружено, что FSL способны к самоассоциации в течение нескольких секунд на почти любой небелковой поверхности, включая металлы, пластик и бумагу, с образованием стабильного гликанового покрытия, сохраняющегося в плазме крови и не удаляющегося в процессе промывки буферными растворами, что значительно расширило область их применения [16].

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ГЛИКОЛИПИДОПОДОБНЫЕ КОНСТРУКТЫ (FSL)

Структура FSL. Как показывает название, конструктор функционального липида со спейсерной группой (FSL) состоит из трех компонентов: функциональной концевой группы («головы»), спейсерной группы и липидного «хвоста». Несмотря на то, что функциональная концевая группа играет ключевую роль как биологически активный компонент, спейсерная группа и липид также важны, обеспечивая встраивание в мембрану или ассоциацию на поверхности. Варьируя эти группы, можно конструировать множество вариантов FSL, при этом целенаправленно изменяя презентацию, ориентацию, дистанцирование от мембраны группы F, что дает возможность влиять на биологическую активность FSL в целом.

Функциональная концевая группа. Эта группа обычно является биологически активным компонентом в составе FSL и может быть практически любой [17], но лучше гидрофильной для обеспечения амфифильности FSL; амфифильность способствует самоассоциации и спонтанному встраиванию в мембрану или процессу покрытия поверхности. Были синтезированы FSL, которые содержали в качестве функциональных групп гликаны, пептиды, белки, метки, флуорофоры, металлы, субстраты ферментов, хелатирующие агенты, олигонуклеотиды, химически реакционноспособные группы (в частности, для «клик-химии»), но в контексте данного обзора будут обсуждены только гликаны. Гликаны в диапазоне от моносахаридов до олигосахаридов, вплоть до 100 моносахаридных остатков, были использованы для получения FSL [15–19]. Хотя верхний предел размера гликана еще не установлен, слишком большая функциональная «голова» потенциально может мешать процессу встраивания/самоассоциации. Во из-

бежание этого для больших функциональных групп можно применить двухстадийный подход, при котором на первом этапе F представляет собой реакционноспособную неуглеводную группу, которая может взаимодействовать с надлежащим образом модифицированным гликаном. Обычно используют FSL с биотином в качестве функциональной «головы», которые могут затем «захватывать» биотинилированный гликан через авидиновый мостик [15]. Однако существуют и альтернативные подходы, например, использование FSL с малеимидом, применение «клик-химии», субстрат-ферментного взаимодействия или хелатирующих агентов, при наличии соответствующим образом модифицированных гликанов.

Спейсерная группа. Спейсерная группа является той принципиальной составной частью FSL, которая отличает FSL от природных глико-

липидов. Наличие спейсерной группы привносит дополнительные свойства, не всегда присущие природным гликолипидам, включая в некоторых случаях модулирование биологической активности гликана. Спейсерная группа делает более простой химию конъюгации липидного «хвоста» с функциональной «головой», но она также способствует растворимости FSL в воде и дает возможность варьировать расстояние между гликаном и мембраной/поверхностью, что позволяет уменьшить стерические затруднения при представлении гликанов на поверхности. К настоящему времени синтезирован ряд простых и сложных вариантов (рис. 1), включая спейсеры разной длины, а также разветвленные и функционализированные – для создания дополнительных биологических эффектов. Более длинные и мультивалентные спейсерные группы могут повысить чувствительность методов опреде-

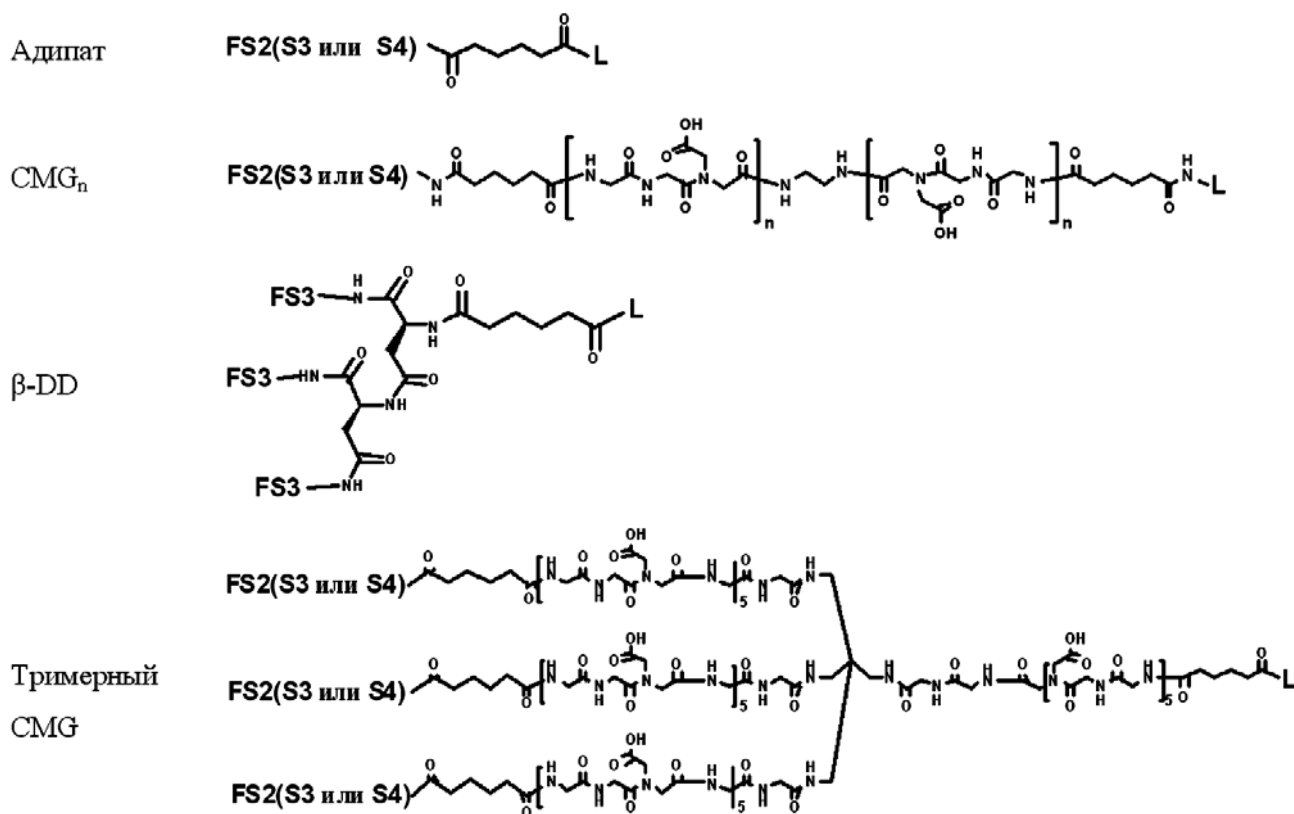


Рис. 1. Структурные вариации спейсерных групп, использованных для получения FSL. Возможные функциональные концевые группы, относящиеся к каждому спейсеру (табл. 1), и липидные «хвосты» (рис. 2) обозначены буквами F и L соответственно. Коды для обозначения спейсеров и преспейсеров приведены в табл. 2. Верхний спейсер – адипат, обеспечивает (вместе с преспейсером гликанов) дистанцирование гликана от клеточной мембраны на расстояние 1,9 нм. CMG_n – линейные спейсеры, основанные на частично карбоксиметилированном олигоглицине, могут быть синтезированы с разным значением *n*, но для получения FSL в основном используются CMG₂ (см. также рис. 3), которые обеспечивают дистанцирование гликана от поверхности на расстояние 7,2 нм. β-DD-кластер содержит три гликана, присоединенные к одному липидному «хвосту» посредством короткого (~2 нм) спейсера. Тримерный CMG-спейсер использовался в синтезе пептидных FSL и еще не применялся для гликанов, хотя и является пригодным для этого

ления гликанов на поверхности клетки (неопубликованные данные). В трех- и четырехвалентных вариантах, сконструированных таким образом, чтобы обеспечить жесткость конструкции, дистанцирование гликанов открывает путь к оптимизации связывания с мультисубъединичными белками (в частности, лектинами) — здесь важно, чтобы расстояние между гликанами соответствовало расстоянию между гликан-связывающими доменами белка.

Желательно, чтобы спейсерный участок FSL был биологически инертным, т.е. не реагировал с неразбавленной сывороткой, не стимулировал иммунную систему (включая толл-подобные рецепторы и систему комплемента), не являлся токсичным и не инициировал каких-либо иных неспецифических биологических эффектов [20–22]. До настоящего времени для использованных спейсерных групп (рис. 1) таких эффектов не наблюдалось как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo* [20–22].

Липид. Липидный «хвост» природного гликолипида заякоривает гликан на поверхности

мембраны [4], к такому же эффекту приводит липидный фрагмент FSL. Его природа влияет на амфифильные свойства молекулы и в совокупности с функциональной «головой» и спейсером определяет способность FSL диспергироваться в воде, а также спонтанно самоассоциировать на поверхности. Для конструирования FSL был использован ряд липидов (рис. 2), включая 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE, L1, табл. 1), холестерин (L2, табл. 1), а также природные и синтетические церамиды. В том же качестве были проверены и другие липиды, например, 1,2-О-дистеарил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPE), гас-1,2-диолеилглицерин (DOG) и моноацилоктадекановая кислота, но они не получили регулярного использования, поскольку либо не давали преимуществ, либо уступали DOPE в способности обеспечивать быстрое диспергирование в воде, встраивание в клетки и спонтанную самоассоциацию на поверхностях.

В целом FSL с липидными «хвостами», представленными церамидом и DOPE, являются

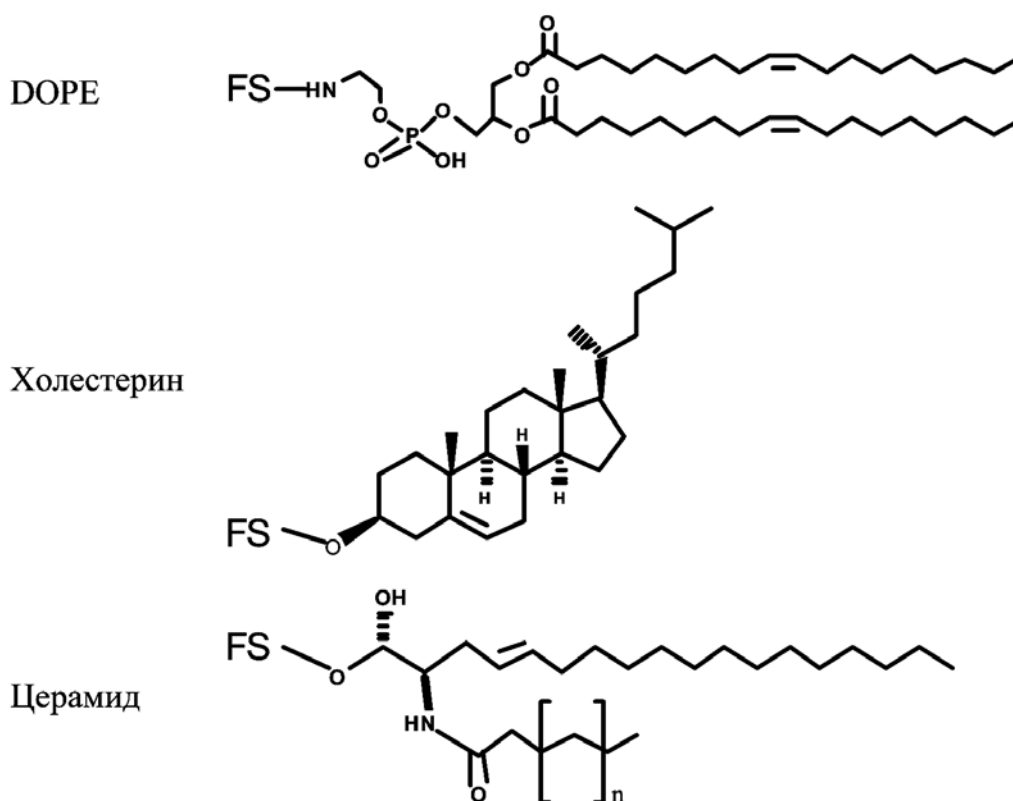


Рис. 2. Липиды, обычно используемые для получения FSL. Возможные функциональные концевые группы, относящиеся к каждому липиду (табл. 1), и спейсеры (рис. 1) обозначены буквами F и S соответственно. Церамид использовался для получения FSL с биотином в качестве функциональной «головы» и еще не применялся для гликанов, но является пригодным для этого

Таблица 1. Гликаны в различных вариантах, синтезированных FSL

Сокращение	Структура гликана	Вариации липид–спейсер		Ссылки
		DOPE (L1), спейсеры (табл. 2)	холестерин (L2), спейсеры (табл. 2)	
1	2	3	4	5
Олигосахариды групп крови				
A _{tri}	GalNAcα3(Fucα2)Galβ	S3S1, S3S5, S3S6, S3S7	S3	[15–21, 23–27]
B _{tri}	Galα3(Fucα2)Galβ	S3S1, S3S5		[15–21, 23–27]
H _{di}	Fucα2Galβ	S3S1		
H2	Fucα2Galβ4GlcNAcβ	S3S1	S3	
A1	GalNAcα3(Fucα2)Galβ3GlcNAcβ	S3S5	S3	[18]
A2	GalNAcα3(Fucα2)Galβ4GlcNAcβ	S3S1, S3S5	S3	[16, 18]
A3	GalNAcα3(Fucα2)Galβ3GalNAcα	S3S1	S3	[18]
A4	GalNAcα3(Fucα2)Galβ3GalNAcβ	S3S5		[18]
B1	Galα3(Fucα2)Galβ3GlcNAcβ	S3S5		[18]
B2	Galα3(Fucα2)Galβ4GlcNAcβ	S3S1, S3S5		[15, 18]
B3	Galα3(Fucα2)Galβ3GalNAcα	S3S1, S3S5		[18]
B4	Galα3(Fucα2)Galβ3GalNAcβ	S3S1		[18]
AcqB	GalNH ₂ α3(Fucα2)Galβ	S3S1		[18, 27]
Galili	Galα3Galβ4GlcNAcβ	S3S1		[16, 17, 28, 29]
Le ^a	Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	S3S1		[17, 18, 27]
Le ^x	Galβ4(Fucα3)GlcNAcβ	S3S1		
Le ^b	Fucα2Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	S3S1, S3S5		
Le ^y	Fucα2Galβ4(Fucα3)GlcNAcβ	S3S1, S3S5		
ALe ^b	GalNAcα3(Fucα2)Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	S3S5		
BLe ^b	Galα3(Fucα2)Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	S3S5		
ALe ^y	GalNAcα3(Fucα2)Galβ4(Fucα3)GlcNAcβ	S3S5		
BLe ^y	Galα3(Fucα2)Galβ4(Fucα3)GlcNAcβ	S3S5		
Fs2	GalNAcα3GalNAcβ	S3S1		[16, 30]
Fs5	GalNAcα3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glcβ	S2S1		[16]
Gb3 (P ^k)	Galα4Galβ4Glcβ	S2S1		[17, 20, 21, 24]
P	GalNAcβ3Galα4Galβ4Glcβ	S3S1		
P ₁	Galα4Galβ4GlcNAcβ	S2S1		

1	2	3	4	5
	Сиаблированные			
Neu5Ac3'LN	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc β	S3S1, S3S5		[15]
Neu5Gc3'LN	Neu5Gc α 3Gal β 4GlcNAc β	S3S1		
Neu5Ac6'LN	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β	S3S1, S3S5, S3S6		[15]
Neu5Gc6'LN	Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β	S3S1		
Neu5Ac3'Lac	Neu5Ac α 3Gal β 4Glc β	S4S1		
SiaTn	Neu5Ac α 6GalNAc α β	S3S1		
YDS	(Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α) ₂ 3,6Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc β	S4S1		
	Другие			
	Gal α	S3S1		[21]
	Gal β	S3S1		
	GalNAc β	S3S1		
Lac	Gal β 4Glc β	S3S1		
TF	Gal β 3GalNAc α	S3S1		
α -LN	Gal α 4GlcNAc β	S3S1		[28]
A _{di}	GalNAc α 3Gal β	S3S1		[28]
LNnT	Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β	S4S1		
i (LN ₂)	Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β	S2S1		
GA1	Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β	S3S1		
LNFP I	Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β	S4S1		
Гиалуронат	GlcA β 3[GlcNAc β 4GlcA β 3] _n GlcNAc-аминоальдитол	S1		[15, 19]
Man ₃	Man α 6(Man α 3)Man β	S4S1		

ся лучшими для встраивания и долговременного удерживания в мембране (неопубликованные наблюдения). Нужно заметить, что легким встраиванием и надежным удерживанием в мембране не исчерпывается список свойств, которые ожидаются от FSL в дальнейших исследованиях. В частности, природа липидного фрагмента влияет на способность гликана узнаваться белком-контррецептором. Считается, что именно поэтому FSL-Gb3 способен предотвращать заражение мононуклеаров периферической крови вирусом иммунодефицита человека [20].

СИНТЕЗ НЕОГЛИКОЛИПИДОВ S

Конструирование FSL включает синтез олигосахаридов (F), синтез соответствующих спейсерных групп (S) и несколько подходов для конъюгации спейсеров (S) и липидов (L), а затем блоков спейсер–липид (SL) с гликанами (которые, в свою очередь, могут иметь короткий преспейсер для облегчения конъюгации). Полное описание получения FSL с разными спейсерными группами приведено ранее [15].

Здесь мы даем краткий обзор основных стадий синтеза.

Гликаны. Все функциональные гликаны (за исключением гиалуроновой кислоты), использованные для получения FSL (табл. 1), имеют преспейсеры (S2, S3 или S4, табл. 2) с терминальной NH₂-группой для дальнейшей модификации и, до некоторой степени, унификации синтеза FSL. 2-Аминоэтил (S2) и 3-аминопропил (S3) гликозиды гликанов, приведенных в табл. 1, были получены, как описано в работах Бовина с соавт. [31–46]. В синтезе N-глицилгликозидов (S4) из природных или синтетических восстанавливающих олигосахаридов (OS) мы следовали методологии, описанной в работе Тузикова с соавт. [47]. Восстанавливающие OS превращали в гликозиламино-1-N-глицильные производные путем последовательной обработки NH₄HCO₃, хлоркусуным ангидридом и водным NH₃ (схема 1).

Олигомеры (8–15 кДа) гиалуроновой кислоты (HA) переводили в HA-гликамы восстановительным аминированием с использованием ацетата аммония и цианоборгидрида натрия (схема 2) [19].

Кластерный (трехвалентный) по лиганду FSL-β-DD(A_{tri})₃ синтезировали из трисахарида А в форме 3-аминопропилгликозида присоединением трех гликанов к карбоксильным группам β-L-аспартил-L-аспарагиновой кислоты (β-DD) [48] (схема 3).

Блоки спейсер–липид и конечные FSL-конструкты. Общая процедура синтеза всех FSL приведена на схеме 4. Во-первых, конъюгацией DOPE с бис(N-гидроксисукцинимид)адипатом получали активированное SL-производное – 1,2-ди-О-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолмин (DOPE-Ad-ONSu). Конденсация амино-

Таблица 2. Спейсеры в составе FSL. Расшифровка структур спейсеров, упоминаемых в табл. 1

Код спейсера	Структура
S1	–O(CH ₂) ₄ C(O)NH–
S2	–O(CH ₂) ₂ NH–
S3	–O(CH ₂) ₃ NH–
S4	–NHC(O)CH ₂ NH–
S5	CMG ₂
S6	CMG ₄

терминированных гликанов (OS-sp-NH₂) с DOPE-Ad-ONSu приводила к FSL с коротким (адипиновым) спейсером. Аналогично получали FSL-конструкты с трехвалентным β-DD(A_{tri})₃ кластером. Для синтеза FSL, содержащих карбоксиметилглицильный спейсер (Glyc-Ad-CMG_n-DOPE, n = 2 или 4), использовали другой подход. Реакцией диаминопроизводного CMG с DOPE-Ad-ONSu получали аминотерминированный CMG_n-DOPE, который затем конденсировали с активированными гликанами (OS-sp-Ad-ONSu) (схема 4).

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТЕЙ FSL-КОНСТРУКТАМИ

Синтезированные к настоящему моменту FSL приведены в табл. 1. Для некоторых гликанов получены FSL с разными комбинациями спейсер–липид (рис. 3). После синтеза и лиофилизации FSL представляют собой аморфный белый порошок, растворимый в водных буфер-

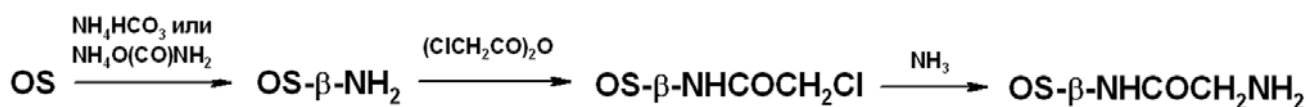


Схема 1. Синтез N-глицилгликозидов

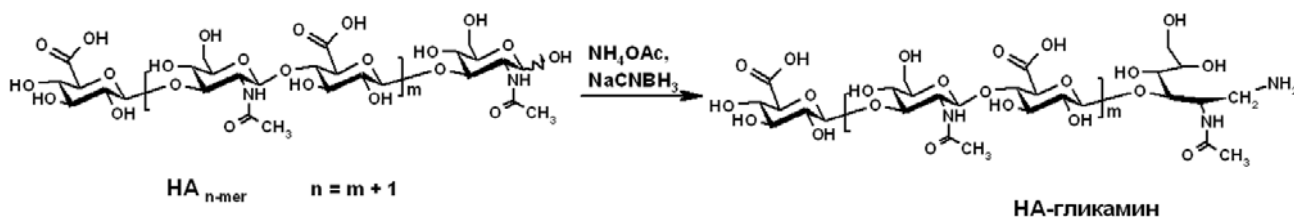
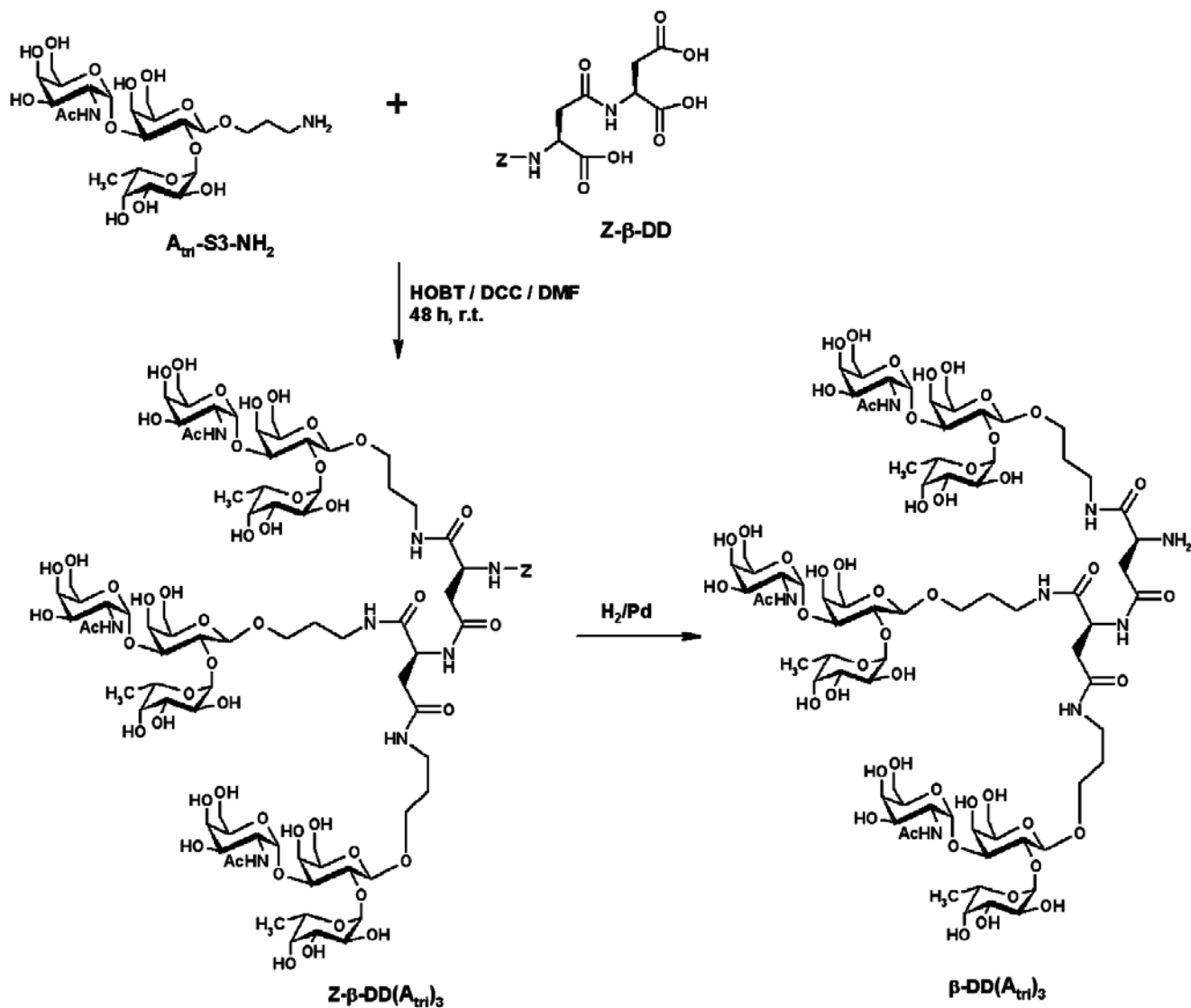


Схема 2. Синтез гликамынов гиалуроновой кислоты

Схема 3. Получение кластера β -DD(A_{tri})₃

ных растворах и воде. Обычно эти соединения стабильны и могут храниться в сухом виде при комнатной температуре в течение многих лет без признаков разложения. FSL также стабильны при хранении в буферных растворах, имеются примеры их хранения в стерильном PBS в течение более шести лет при 4°. Однако несмотря на стабильность в буферных растворах, FSL-конструкты разлагаются в деионизованной воде, что, возможно, происходит из-за локального изменения pH в мицеллах, которое приводит к гидролизу сложноэфирной связи в липиде. В целом FSL растворяются в воде, образуя прозрачные растворы при концентрациях <50 мг/мл (при более высоких концентрациях они образу-

ют гель), и могут быть использованы для получения биологически активных модифицированных гликанами клеток/поверхностей в концентрациях от 5 мкг/мл. Как правило, рабочие концентрации FSL в растворе находятся в диапазоне 10–100 мкг/мл, но для каждого конкретного гликана или вида исследования концентрация оптимизируется.

С помощью FSL можно модифицировать большинство биологических мембран (клетки, вирусы, бактерии, даже целые организмы), липосомы и небиологические поверхности (пластик, металлы, резина, бумага и т.д.), включая гидрофобные и гидрофильные поверхности (табл. 3 и 4). К настоящему моменту оказалось

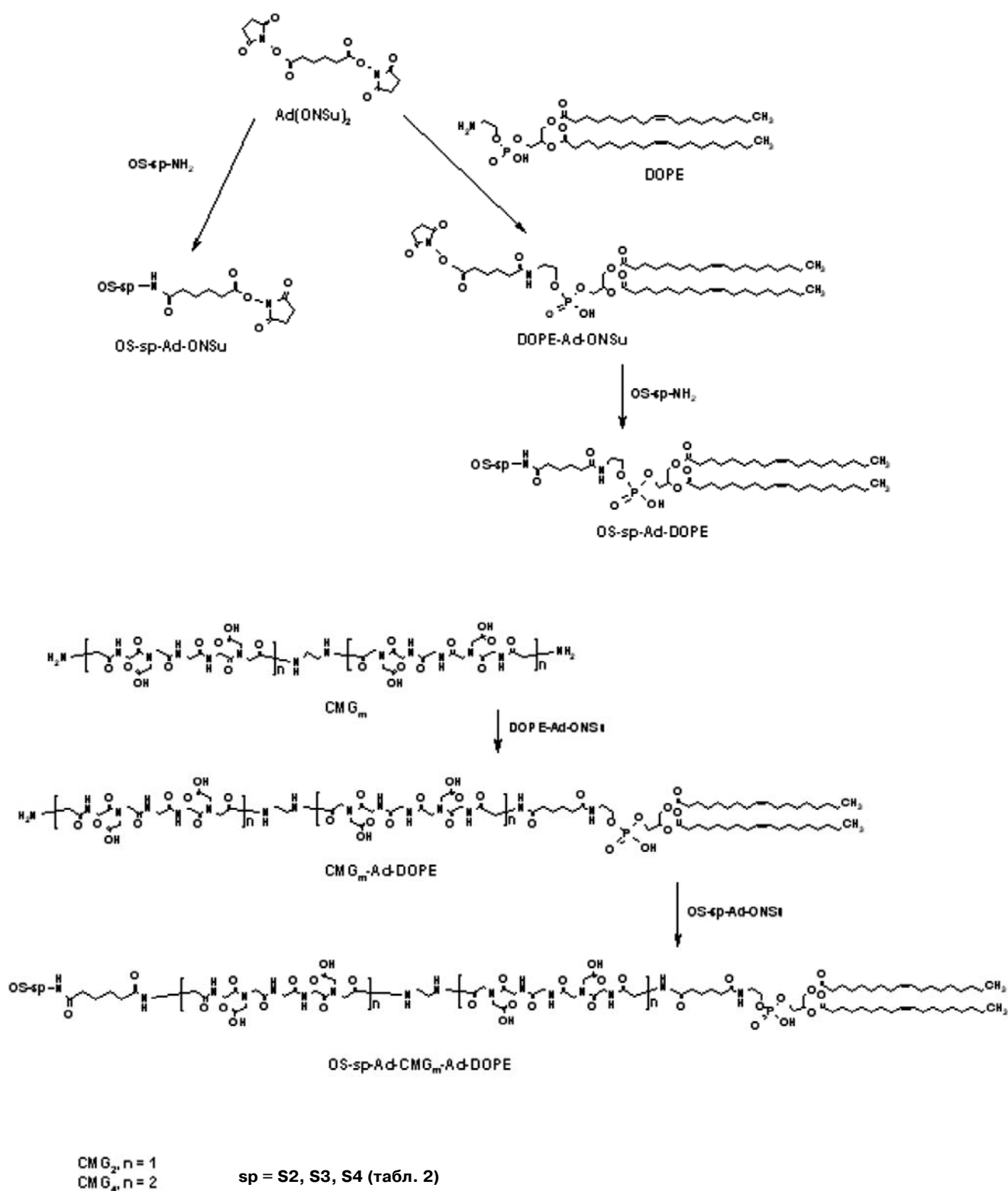


Схема 4. Общая процедура синтеза FSL-конструктов

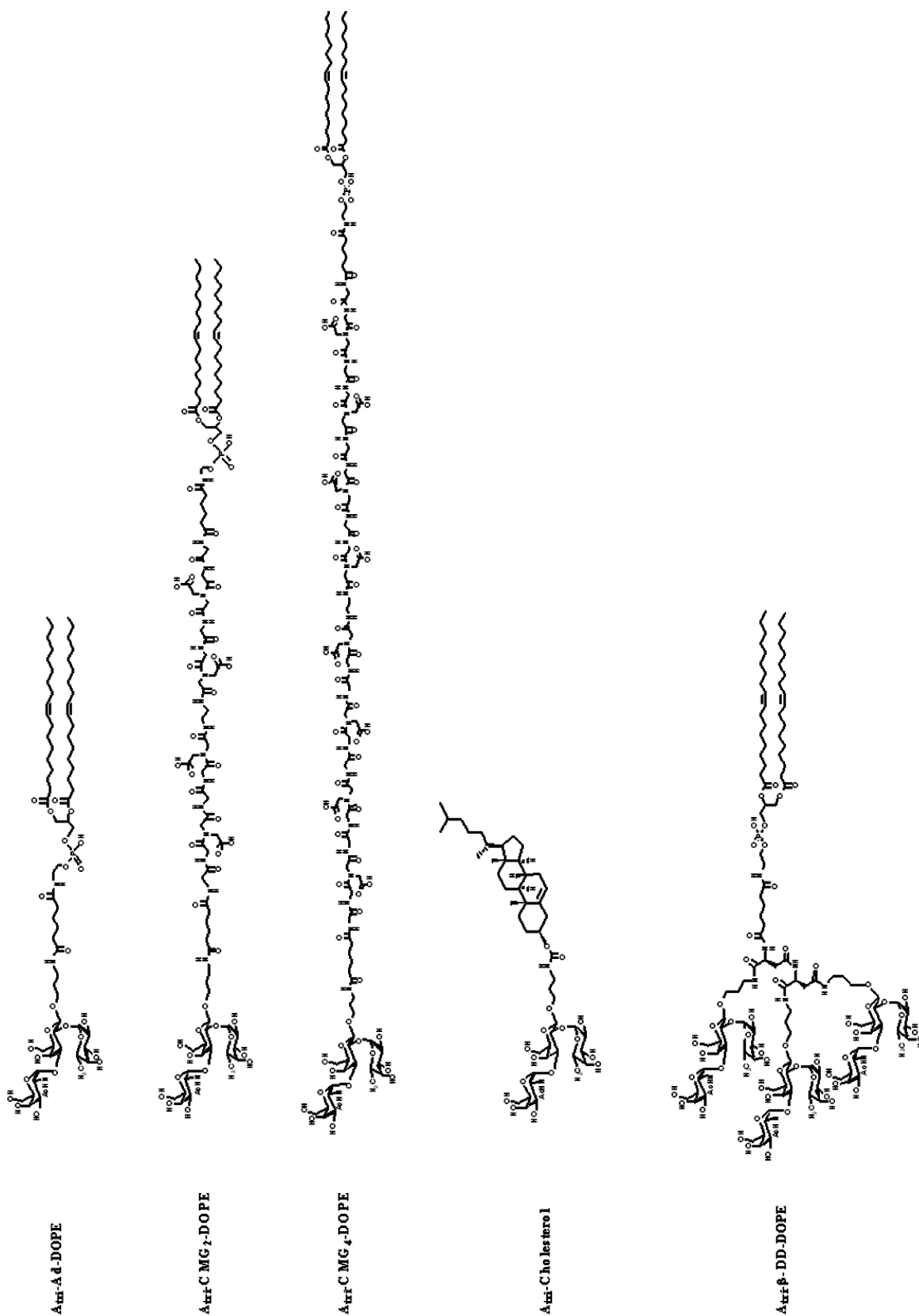


Рис. 3. Примеры использованных в биологических исследованиях вариантов A_{lip}-FSL, где A_{lip} — детерминантный трисахарид антигена группы крови А. Верхний FSL, обозначенный как A_{lip}-Ad-DOPE, представляет А-трисахарид на коротком адипатном спейсере с DOPE в качестве липидного «хвоста». Следующие два FSL (A_{lip}-CMG₄-DOPE и A_{lip}-CMG₄-DOPE), также с липидным «хвостом» DOPE, имеют разную длину CMG-спейсеров. A_{lip}-Cholesterol с холестерином в качестве липидного фрагмента является менее эффективным, чем производные с DOPE, но тем не менее пригодным для модификации плазматических мембран и поверхностей различных материалов. Последний FSL, A_{lip}-β-DD-DOPE, — пример полилигандного (тримерного) FSL с коротким спейсером

Таблица 3. Опубликованные данные по применению FSL в биологических исследованиях

Применение		Клетки/поверхности, модифицированные FSL	Гликаны в составе FSL	Ссылки
Серология	контроль качества, обучение	эритроциты	A _{tri} , B _{tri}	[23, 26]
	имитация антигенов групп крови	эритроциты	A _{tri} , B _{tri} , AcqB, Le ^a	[25, 27]
	картирование антител	эритроциты	A1, A2, A3, A4, B1, B2, A _{tri} , B _{tri} , AcqB, Le ^a , Fs2, Fs5	[16, 18, 27]
	ксеноантигены		Galili, Fs2, Fs5	[16, 18, 49]
Методология	проточная цитофлуорометрия	эритроциты	A _{tri} , B _{tri}	[50]
	ИФА	бумага, нейлон, нановолокна	A1, A2, A3, A4, B1, B2, A _{tri} , B _{tri} , AcqB, Le ^a , Fs2, Fs5	[16, 18]
	иммобилизация	эритроциты	A _{tri}	[51]
	бактериальная адгезия	эритроциты	Fs2	[30]
Иммунология	реакции при переливании крови	мышинные эритроциты	A _{tri}	[21, 24]
	нейтрализация антител	плазма, мышинные эритроциты	A _{tri}	[21]
	активация комплемента	эритроциты	A _{tri} , Galili, α-LN, A _{di}	[28, 29]
	имитация антигенов	клетки Jurkat CT, мононуклеары	Gb3	[20]
Вирусология	взаимодействие с вирусом гриппа	эритроциты	Neu5Ac3'LN, Neu5Ac6'LN	[16]
	ингибирование ВИЧ	клетки Jurkat CT, мононуклеары	Gb3	[20]
Токсины	связывание веротоксина	силикагельные пластинки для ТСХ	Gb3	[20]
Эмбрионы	адгезия	мышинные эмбрионы	HA	[52]

невозможным модифицировать только несколько поверхностей, в частности клетки дрожжей. Хотя было показано, что покрытие гидрофильных поверхностей происходит так же легко, как и покрытие поверхностей гидрофобных, остается неясным, как именно идет присоединение FSL к гидрофильным поверхностям. По-видимому, адгезия FSL осуществляется по нес-

кольким механизмам. Все из них обусловлены необходимостью «вытеснения воды», что может происходить за счет образования водородных связей, а также ван-дер-ваальсовых, электростатических и ионных взаимодействий (и их комбинаций) [50, 53–56]. Участие спейсерных групп в FSL-модификации поверхности, по-видимому, минимально, поскольку не было обна-

Таблица 4. Небиологические поверхности, успешно модифицированные с помощью FSL

Общая категория	Материал (форма)
Производные целлюлозы	нитроцеллюлоза, триацетат целлюлозы, смесь эфиров целлюлозы, регенерированная целлюлоза, ацетат целлюлозы (мембранные фильтры)
Бумага	26 видов, включая сорта с покрытием и без покрытия, блестящую/матовую, в большом диапазоне значений плотности и типа волокон
Силикагель	C18, C60 (пластинки для ТСХ)
Синтетические полимеры	политетрафторэтилен (фильтр), полипропилен (фильтр), полиамид 66 нейлон (нановолокно, фильтр, 3D объекты), полиэфир сульфон (фильтр), поливинилиденфторид (фильтр), полиэстер (фильтр, пленка), поликарбонат (микросферы, пленка), полистирол (микропланшеты, микросферы)
Натуральные волокна	хлопок (ткань), шелк (ткань)
Стекло	кварцевое стекло (волокно, монолит)
Металлы	алюминий (фольга), серебро (фильтр, ткань, фольга), золото (фольга), нержавеющая сталь 304/316 (листы)

ружено существенной разницы в адгезии конструкторов, имеющих CMG- (или его незаряженный O-метилированный аналог) или адипиновый спейсер.

Предполагаемый механизм модификации липидных мембран клеток, вирусов или липосом включает внедрение липидного «хвоста» FSL в липидную мембрану. Механизм этого процесса более сложен, нежели самоассоциация FSL на небиологических поверхностях. По-видимому, относительно стабильным FSL-мицеллам сначала необходимо ассоциировать посредством внешнего гидрофильного слоя с гликокаликсом плазматических мембран, а после этого диссоциировать, что позволяет липидному «хвосту» одиночных молекул FSL внедриться в гидрофобную плазматическую мембрану. Именно из-за этой многостадийности процесс встраивания в клетки занимает значительно больше времени (до часа) по сравнению с небиологическими поверхностями (обычно требуется от нескольких секунд до минут).

При условии, что поддерживаются одинаковыми концентрация FSL в растворе и экспериментальные условия контакта (время, температура, состав буферного раствора, соотношение FSL/количество клеток и т.д.), процесс модификации FSL-конструктами хорошо воспроизводим и контролируем [23]. Для разных экспериментов проведения модификации поверхностей в контролируемых условиях разница между уровнями FSL-покрытия не превышает 5%. В целом родственные FSL образуют слой ассоциа-

та одинаково, но поскольку природа мицелл определяется комбинацией функциональной группы, спейсера и липида, а также температурой, концентрацией, размером молекулы, ее гидрофобностью/гидрофильностью, то незначительные различия в способности модифицировать поверхности могут существовать между различными FSL или при использовании смесей двух разных FSL. Встраивание в клетки обычно требует не менее 30 мин, в то время как покрытие небиологических поверхностей занимает секунды. Более длительная инкубация может повысить содержание FSL на любой поверхности, а на небиологических поверхностях могут образоваться многослойные структуры. После того, как FSL-покрытие сформировалось, оно относительно устойчиво к отмывке водой, мягкими детергентами, липидсодержащей сывороткой крови и, до некоторой степени, метанолом. Тем не менее выбор растворителя (например, воды или метанола), используемого при нанесении FSL на поверхность, очень важен, т.к. он влияет на характер самоассоциации FSL. Нужно признать, что в настоящее время истинная супрамолекулярная организация FSL в водной среде и на поверхностях скорее постулируется, чем известна, что тормозит и понимание механизмов встраивания в клетки/покрытия поверхностей.

Для того чтобы отличать модификацию FSL-конструктами от других форм модификаций поверхностей и чтобы упростить описание различных вариантов модифицированных клеток, ви-

русов и поверхностей, была предложена специальная терминология [17]. Использование FSL для модификации поверхностей было обозначено как технология KODE (KODE Technology) [17, 18, 24, 25]; клетки, модифицированные FSL-конструктами, именуется кодецитами (codeocytes) [17, 18, 24, 25], а вирусы – кодевирионами (codevirions) [19, 57]. Поверхности, модифицированные FSL-конструктами, обозначаются как *koded*.

FSL-модификация биологических объектов.

FSL были использованы для специфического изменения профиля гликозилирования на различных типах живых клеток, включая клетки крови, клеточные линии, эмбрионы, сперматозоиды (табл. 3, рис. 4), а также на стволовых клетках (неопубликованные результаты). В дополнение к модификации разнообразных клеток млекопитающих другие клетки, такие как прокариотические бактерии (неопубликованные результаты) и вирусы [57], были аналогичным образом FSL-модифицированы. Процесс введения FSL в плазматическую мембрану не причиняет видимого вреда модифицированным клеткам (условия введения мягкие, а именно физиологический буфер, концентрация FSL < 500 мкг/мл). Полученные кодециты демонстрировали нормальную функциональность и жизнеспособность, в то же время проявляя «наведенную» биологическую активность благодаря модификации гликаном. В дополнение к гликанам в кодециты часто вводят второй FSL – как метку (флуорофор, ^{125}I или биотин) для обеспечения визуализации и/или извлечения кодецитов из *in vivo/in vitro* окружения [21, 24, 57].

Процесс FSL-модификации клеток *in vitro* является одним и тем же для всех клеток: простая инкубация клеток с FSL, диспергированным в среде, свободной от липидов (например, в физиологическом растворе), в течение 30–120 мин при 37° [15–19, 21–27]. Однако пределы температуры введения в плазматические мембраны могут меняться от 4 до 37°, для введения FSL при пониженных температурах необходимо более длительное время. Как правило, 1–2 ч при 37° эквивалентны 4–6 ч при 22° и 18–24 ч при 4°. Обычно (но не обязательно) берут клетки в «концентрации», близкой к 100%, и смешивают с равным объемом раствора FSL. Концентрация раствора FSL определяет, сколько его встроится в клеточную мембрану за определенный период времени. Если концентрация FSL относительно низкая (менее 100 мкг/мл), через 1 ч при 37° более 95% FSL из раствора будет встроено в клеточную мембрану. Такой же уровень модификации мембран может быть достигнут при более высокой концентрации FSL (до 1000 мкг/мл) за

меньшее время, но это потребует необходимости отмывки клеток от остаточного FSL для остановки процесса встраивания. После FSL-модификации кодециты могут быть возвращены в среду, содержащую липиды, в т.ч. в сыворотку крови.

В отличие от генно-инженерных подходов (трансфекция гликозилтрансферазы, нокаут гликозидазы) модификация клеток с использованием FSL является временной. Скорость потери FSL определяется активностью мембраны, процессами эндоцитоза и деления клеток, а также составом окружающей среды и температурой. В то же время метаболически неактивные клетки (эритроциты/фиксированные клетки [17]) остаются FSL-модифицированными в течение неограниченного времени при хранении в среде, свободной от липидов. Если кодециты находятся в присутствии липидов сыворотки крови, то происходит утечка FSL в плазму (повидимому, замещение липидами плазмы) со скоростью ~1% в час при 37° (при этом не происходит достоверно определяемого их встраивания в другие клетки) [21, 24]. В зависимости от типа клеток обычно через 24 ч количество FSL в составе мембраны значительно снижается, а через три дня они не детектируются совсем. Свидетельств того, что клетки, бывшие кодециты, не смогут нормально существовать после потери FSL со своих мембран, нет [21, 22].

Кодециты также могут образовываться *in vivo* при внутривенном введении больших доз FSL [21, 22]. Модификация *in vivo* клеток, циркулирующих в периферической крови, является неспецифической. Поскольку все циркулирующие клетки становятся носителями остатка F, модификация *in vivo* требует значительно большего количества материала (примерно в 40 раз больше, чем при реакции в физиологическом растворе), т.к. FSL преимущественно связываются с циркулирующими липидами плазмы [21].

Модификация небиологических поверхностей с использованием FSL. Простота создания и стабильность гликоповерхностей, получаемых в результате FSL-модификации, дает возможность применять их в твердофазных методах анализа, например, в иммуноферментном анализе (ИФА), биосенсорах, скрининге с помощью микрочипов, технологиях с использованием микрочастиц, поверхностном плазмонном резонансе и т.д. Процесс FSL-модификации небиологических поверхностей заключается в контакте поверхности с раствором, содержащим один или несколько типов FSL [16–18]. Нанесение FSL на поверхность можно проводить посредством погружения, заливания, разбрызгивания, рисования кистью или с использованием

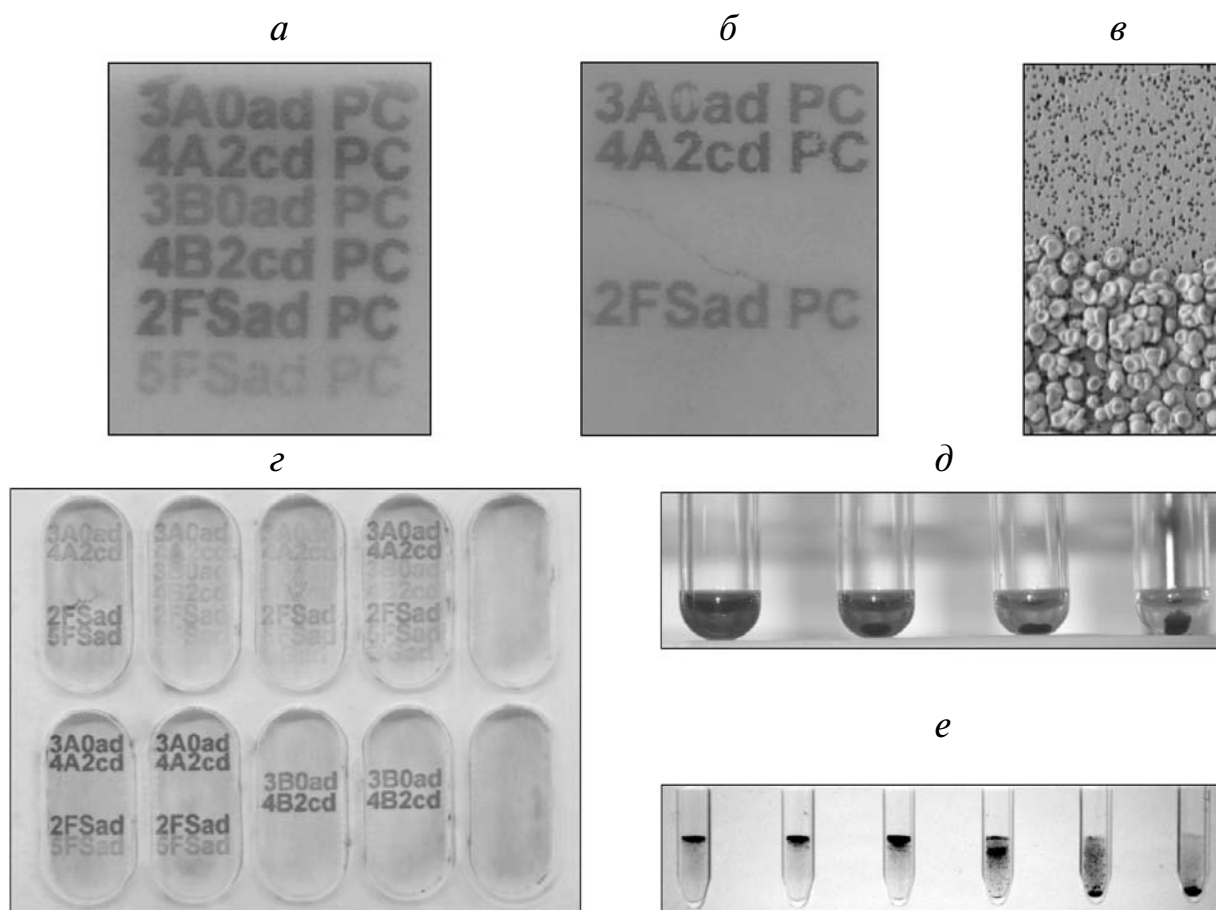


Рис. 4. Примеры применения FSL. *a* – ИФА-картирование антигликановых антител. В данном примере шесть разных FSL с гликанами, относящимися к системе групп крови АВО, были напечатаны с помощью струйного принтера на поликарбонатной поверхности и использованы для картирования специфичности моноклонального анти-АВ-антитела. Активность определяли по появлению буквенно-цифровых обозначений после проявления в ИФА (детали описаны ранее [16, 18]). Поликарбонатная поверхность, использованная в данном примере, может быть заменена большинством других поверхностей, перечисленных в табл. 4, со схожими результатами; *b* – «захват» (связывание) эритроцитов группы крови А анти-А-антителами, связанными на «А-реактивных» FSL, т.е. на тех гликанах, которые взаимодействуют с анти-А-антителами. Планшет приготовлен идентично ИФА-планшету (планшет *a*) за исключением того, что на этот раз визуализация активности анти-А реагента происходила посредством «захвата» эритроцитов группы крови А. Этот вариант «захвата» клеток антителами необходим в тех случаях, когда ИФА-субстраты не способны преципитироваться или адгезироваться на поверхностях, а также может быть использован для специфического «захвата» клеток; *в* – сканирующая электронная микроскопия эритроцитов, захваченных антителами, реагирующими с FSL. Данное изображение представляет 500× увеличение зоны на планшете *b*. В верхней зоне, где связанные клетки отсутствуют, FSL-конструкта нет, в то время как в нижней зоне напечатан FSL – здесь происходит специфический «захват» эритроцитов группы крови А посредством взаимодействия с анти-А-антителами, связанными с напечатанным FSL; *г* – ИФА-картирование [16, 18] специфичности различных образцов поликлональной сыворотки на гликанах FSL, напечатанных с использованием струйного принтера на бумаге. Каждая из лунок представляет разные образцы сыворотки, а знаки, ставшие видимыми, указывают на специфичность антител, представленных в данном образце. Разная интенсивность окраски знаков позволяет полуколичественно оценить уровень специфических антител в образцах; *д* – регулируемый гемолиз кодецитов, содержащих разное количество встроенных FSL. В данном примере разные количества FSL-Galili (табл. 1) были использованы для превращения человеческих эритроцитов в Galili-кодециты. При инкубации Galili-кодецитов с человеческой сывороткой естественные анти-Galili антитела связываются с Galili-кодецитами и активируют систему комплемента по классическому пути, что приводит к гемолизу кодецитов. Гемолиз можно регулировать от практически 100% (крайняя левая реакция, соответствует 20 мкг/мл FSL-Galili) до 0% (крайняя правая реакция, 1 мкг/мл FSL-Galili) путем уменьшения количества FSL в кодецитах; *е* – определение уровня антител с использованием стандартизованных кодецитов. Кодециты, приготовленные с использованием фиксированного (индивидуально определенного для каждого гликана) количества FSL на заданный объем эритроцитов, называются стандартизованными и могут использоваться для типирования различных антигликановых реагентов. В данном примере стандартизованные Galili-кодециты были использованы для определения титра анти-Galili антител в образцах поликлональной сыворотки. На рисунке показано распределение агглютинатов кодецитов в гелевой матрице (технология гелевой карточки) при серийном разведении сыворотки. Крайняя левая реакция сильно положительная (неразведенная сыворотка), а реакция справа – отрицательная (разведение 1 : 32), что указывает на титр, равный 16 для анти-Galili IgM в исследуемом образце. Могут быть дополнительно использованы анти-IgG гелевые карточки для определения титров IgG

струйного принтера [16–18]. При контакте с поверхностью мицеллы FSL быстро, в течение секунд спонтанно самоассоциируют на поверхности или внутри нее (если она пористая) [50, 53–56]. Т.к. немногие поверхности являются гомогенными, многочисленными факторы (гидрофильность, заряд, ландшафт, зоны предпочтительной адсорбции и т.д.), а также выбранный для FSL растворитель влияют на процесс первичного взаимодействия FSL с поверхностью и ассоциацию на ней, а также последующую устойчивость FSL к удалению с поверхности.

Большое количество разнообразных поверхностей было успешно модифицировано FSL (табл. 4, рис. 4). При работе с FSL нужно иметь в виду, что FSL присоединяются к любой (даже гладкой) небиологической поверхности, с которой они контактируют, включая стекло и пластик реакционных сосудов, т.е. эти поверхности могут вести себя подобно объектам (например, частицам), модифицируемым с помощью FSL в данном реакционном сосуде, и что затраченное на это количество FSL очень мало, т.е. потерю можно и не заметить.

Модифицированные поверхности относительно устойчивы к удалению FSL при последующем воздействии буферных растворов и липидов сыворотки крови [16, 18], поверхность практически не изменяется после 30 ч инкубации *in vitro* с сывороткой/плазмой при 37°. FSL-модифицированные поверхности были использованы для количественного определения антител (агглютинация, агрегация, ИФА) [16, 18] и «вылавливания» клеток специфическими лигандами поверхности. Несмотря на простоту FSL-модификации поверхности, условия эксперимента необходимо оптимизировать и стандартизировать для получения устойчиво воспроизводимых результатов.

FSL, где F – гликан, являются удобными инструментами для различных биологических исследований, они уже нашли широкое применение как в гликобиологии, так и в медицине (табл. 3). FSL, содержащие простые или сложные гликаны в качестве функциональной группы, могут быть легко присоединены к клетке, вирусу или твердой поверхности и использованы для изучения этих объектов *in vitro* и/или *in*

vivo, а также для исследования антител и лектинов. Поскольку FSL *per se* являются биологически инертными, а процесс модификации не наносит вреда изучаемым объектам, результаты, получаемые для модифицированных клеток/вирусов, обусловлены именно введенными гликанами; сам по себе процесс модификации является узкоспецифическим, в отличие от альтернативных методологий гликомодифицирования, которые могут влиять на их жизнеспособность и/или функциональность. Возможность использовать одинаковые FSL для модификации биологических и небиологических поверхностей полезна тем, что в тестах *in vitro* можно достоверно моделировать и предсказывать биологические последствия модификаций *in vivo*. Более того, поскольку методика FSL-модификации является надежной, хорошо контролируемой (при использовании идентичных параметров получают одинаковые результаты) и позволяет одновременно использовать на одной поверхности несколько FSL, включая негликановые конструкторы, FSL-технология имеет потенциал для дальнейшего расширения и углубления. В то же время применение FSL имеет некоторые ограничения, основным из которых является то, что содержание материала в модифицированных клетках изменяется во времени. Тем не менее, если исследования с участием модифицированных объектов планируется проводить в пределах 24 ч, то модификация с помощью FSL, по-видимому, является самым простым и наиболее контролируемым методом.

Число применений описанной технологии неуклонно растет (это, в частности, контроль качества, картирование антител, нейтрализация антител и токсинов, диагностика, модификация антигенности клеток и тканей *in vivo*), что делает данную технологию чрезвычайно гибким инструментом для гликобиологических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-50-00131).

Авторы выражают благодарность Н.В. Бовину, Е.К. Уильямс, К. Барр, Д.А. Блейк, Е.Г. Перри, А.Б. Тузикову и И.М. Белянчикову за помощь в подготовке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., and Etzler, M.E. (2009) *Essentials of glycobiology*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
2. Tailor, M.E., and Drickamer, K. (2006) *Introduction to glycobiology*, Oxford University Press, N.Y.
3. Marcus, D.M., and Cass, L.E. (1969) Glycosphingolipids with Lewis blood group activity: uptake by human erythrocytes, *Science*, **164**, 553–555.
4. Sneath, J.S., and Sneath, P.H. (1955) Transformation of the Lewis groups of human red cells, *Nature*, **176**, 172.
5. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes, *Nature*, **387**, 569–572.
6. Simons, K., and Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol, *Science*, **290**, 1721–1726.
7. Tang, P.W., Gool, H.C., Hardy, M., Lee, Y.C., and Feizi, T. (1985) Novel approach to the study of the antigenicities and receptor functions of carbohydrate chains of glycoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 474–480.
8. Palma, A.S., Feizi, T., Childs, R.A., Chai, W., and Liu, Y. (2014) The neoglycolipid (NGL)-based oligosaccharide microarray system poised to decipher the meta-glycome, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **18**, 87–94.
9. Liu, Y., Feizi, T., Campanero-Rodes, M.Z., Childs, R.A., Zhang, Y., Mullou, B., Evans, Ph.G., Osborn, H.M., Otto, D., Crocker, P.R., and Chai, W. (2007) Neoglycolipid probes prepared via oxime ligation for microarray analysis of oligosaccharide-protein interaction, *Chem. Biol.*, **14**, 847–859.
10. Hasegawa, A., and Kiso, M. (1994) Synthesis of sialyl Lewis X ganglioside and analogs, *Methods Enzymol.*, **242**, 158–173.
11. Ando, T., Imamura, A., Ishida, H., and Kiso, M. (2007) 1.2 Synthesis of glycolipids, *Compr. Glycosci.*, **1**, 797–812.
12. Faivre, V., de Lourdes Costa, M., Boullanger, P., Baszkin, A., and Rosilio, V. (2003) Specific interaction of lectins with liposomes and monolayers, *Chem. Phys. Lipids*, **125**, 147–159.
13. Miyashita, H., Ikeda, T., and Nohara, T. (2007) Synthesis of neosaponins and neoglycolipid containing a chacotriosyl moiety, *Carbohydr. Res.*, **342**, 2182–2191.
14. Queneau, Y., Chambert, S., Besseta, S., and Cheai, R. (2008) Recent progress in the synthesis of carbohydrate-based amphiphilic materials: the examples of sucrose and isomaltulose, *Carbohydr. Res.*, **343**, 1999–2009.
15. Korchagina, E., Tuzikov, A., Formanovsky, A., Popova, I., Henry, S., and Bovin, N.V. (2012) Toward creating cell membrane glycolandscapes with glycan lipid constructs, *Carbohydr. Res.*, **356**, 238–246.
16. Barr, K., Korchagina, E., Popova, I., Bovin, N., and Henry, S. (2015) Monoclonal anti-A activity against the FORS1 (Forsman) antigen, *Transfusion*, **55**, 129–136.
17. Blake, D.A., Bovin, N.V., Bess, D., and Henry, S.M. (2011) FSL constructs: a simple method for modifying cell/virion surfaces with a range of biological markers without affecting their viability, *J. Vis. Experiments*, **54**, e3289. DOI: 10.3791/3289.
18. Barr, K., Korchagina, E., Ryzhov, I., Bovin, N., and Henry, S. (2014) Mapping the fine specificity of ABO monoclonal reagents with A and B type-specific FSL constructs in kodeocytes and inkjet printed on paper, *Transfusion*, **54**, 2477–2484.
19. Carter, N.L., Blake, D.A., Bovin, N.V., Henry, S.M., Korchagina, E.Y., Williams, E.C., and Tuzikov, A.B. (2006) Cell surface coating with hyaluronic acid oligomer derivative, US Patent WO/2007/035116.
20. Harrison, A.L., Olsson, M.L., Jones, R.B., Ramkumar, S., Sakac, D., Binnington, B., Henry, S., Lingwood, C.A., and Branch, D.R. (2010) A synthetic globotriaosylceramide analogue inhibits HIV-1 infection *in vitro* by two mechanisms, *Glycoconj. J.*, **27**, 515–524.
21. Oliver, C., Blake, D., and Henry, S. (2011) *In vivo* neutralization of anti-A and successful transfusion of A antigen incompatible red cells in an animal model, *Transfusion*, **51**, 2664–2675.
22. Lan, C.-C., Blake, D., Henry, S., and Love, D.R. (2012) Fluorescent function-spacer-lipid construct labelling allows for real-time *in vivo* imaging of cell migration and behaviour in zebrafish (*Danio rerio*), *J. Fluorescence*, **22**, 1055–1063.
23. Henry, S. (2009) Modification of red blood cells for laboratory quality control use, *Curr. Opin. Hematol.*, **16**, 467–472.
24. Oliver, C., Blake, D., and Henry, S. (2011) Modeling transfusion reactions and predicting *in vivo* cell survival with kodeocytes, *Transfusion*, **51**, 1723–1730.
25. Hult, A.K., Frame, T., Chesla, S., Henry, S., and Olsson, M.L. (2012) Flow cytometry evaluation of red blood cells mimicking naturally-occurring ABO subgroups following modification with variable amounts of FSL-A and B constructs, *Transfusion*, **52**, 247–251.
26. Perry, H., and Henry, S. (2015) Training students in serologic reaction grading increased perceptions of self-efficacy and ability to recognise serologic reactions but decreased grading accuracy, *Transfusion*, in press.
27. Frame, T., Carroll, T., Korchagina, E., Bovin, N., and Henry, S. (2007) Synthetic glycolipid modification of red blood cell membranes, *Transfusion*, **47**, 876–882.
28. Georgakopoulos, T., Komaraju, S., Henry, S., and Bertolini, J. (2012) An improved Fc function assay utilising CMV antigen coated red blood cells generated with synthetic function-spacer-lipid constructs, *Vox Sanguinis*, **102**, 72–78.
29. Perry, E.H., and Henry, S.M. (2013) Teaching the recognition of hemolysis by controlling antibody mediated *in vitro* hemolysis with kodeocytes, *Transfusion*, **53** (Suppl.), 182A.
30. Svensson, L., Hult, A.K., Stamps, R., Angstrom, J., Teneberg, S., Jorgensen, R., Rydberg, L., Henry, S.M., and Olsson, M.L. (2013) Forssman expression on human erythrocytes: Biochemical and genetic evidence of a new histo-blood group system, *Blood*, **121**, 1459–1468.
31. Bovin, N.V., and Khorlin, A.Ya. (1984) Synthesis of the determinant oligosaccharides of ABH (type 1) blood group antigens and Le^b tetrasaccharide from the same precursor, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **10**, 853–860.
32. Bovin, N.V., and Khorlin, A.Ya. (1985) Convenient method for preparing the Le and ABH (type 1) determinant oligosaccharides, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **11**, 826–829.
33. Bovin, N.V., Zemlyanukhina, T.V., Chagiashvili, C.N., and Khorlin, A.Ya. (1988) Artificial antigens and affinity sorbents of blood-group specificity Le^a, Le^b, and Le^d, *Chemistry of Natural Compounds*, **6**, 777–785.
34. Zemlyanukhina, T.V., and Bovin, N.V. (1990) Synthesis of blood group oligosaccharides with A, B, and H (type 3) specificity, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **16**, 1096–1104.
35. Korchagina, E.Yu., and Bovin, N.V. (1992) Synthesis of spaced trisaccharides with blood group specificities A and B, their fragments and structural analogs, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **18**, 283–298.
36. Ovchinnikova, T.V., Ter-Grigoryan, A.G., Pazynina, G.V., and Bovin, N.V. (1997) Synthesis of terminal disaccharide of Forsman antigen and some of its analogs as spaced glycosides and free disaccharides, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **23**, 55–68.
37. Simeoni, L.A., Byramova, N.E., and Bovin, N.V. (1997) Synthesis of aminopropyl glycoside of the SiaT_n antigen Neu5Aca2-6GalNAca, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **23**, 683–691.

38. Simeoni, L.A., Byramova, N.E., and Bovin, N.V. (2000) Neu5Gc α (2-6)GalNAc α as a spacer glycoside, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **26**, 183–191.
39. Pazynina, G.V., Tyrtsh, T.V., and Bovin, N.V. (2002) Synthesis of histo blood-group antigens A and B (type 2), xenoantigen Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc and related type 2 backbone oligosaccharides as haptens in spacers form, *Mendeleev Commun.*, **12**, 143–145.
40. Pazynina, G., Tuzikov, A., Chinarev, A., Obukhova, P., and Bovin, N. (2002) Simple stereoselective synthesis of α 2-6 sialooligosaccharides, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 8011–8013.
41. Korchagina, E.Y., Pochechueva, T.V., Obukhova, P.S., Formanovsky, A.A., Imberty, A., Rieben, R., and Bovin, N.V. (2005) Design of the blood group AB glycotope, *Glycoconj. J.*, **22**, 127–133.
42. Byramova, N.E., Tuzikov, A.B., Tyrtsh, T.V., and Bovin, N.V. (2007) 1,6-Anhydro-N-acetyl- β -D-glucosamine in oligosaccharide synthesis: II. The synthesis of the spacers Le^x tetrasaccharides, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **33**, 99–109.
43. Korchagina, E.Yu., Ryzhov, I.M., Byrgazov, K.A., Popova, I.S., Pokrovsky, S.N., and Bovin, N.V. (2009) Block synthesis of blood group tetrasaccharides B (types 1, 3 and 4), *Mendeleev Commun.*, **19**, 152–154.
44. Ryzhov, I.M., Korchagina, E.Y., Popova, I.S., and Bovin, N.V. (2012) Block synthesis of A tetrasaccharides (types 1, 3, and 4) related to the human ABO blood group system, *Carbohydr. Res.*, **351**, 17–25.
45. Pazynina, G., Tyrtsh, T., Nasonov, V., Belyanchikov, I., Paramonov, A., Malysheva, N., Zinin, A., Kononov, L., and Bovin, N. (2013) Divergent strategy for the synthesis of α 2-3-linked sialo-oligosaccharide libraries using a Neu5TFA-(α 2-3)-Gal building block, *Synlett.*, **24**, 226–230.
46. Pazynina, G.V., Chinarev, A.A., Tuzikov, A.B., Nasonov, V.V., Malysheva, N.N., and Bovin, N.V. (2013) Synthesis of a spacer-armed 6- α -sialyl-N-acetylglucosamine, in *Carbohydrate chemistry: proven synthetic methods*, Vol. 2, Series: Carbohydrate chemistry (van der Marel, G., and Codee, J., eds), CRC Press, 155–160.
47. Tuzikov, A.B., Gambaryan, A.S., Juneja, L.R., and Bovin, N.V. (2000) Conversion of complex sialooligosaccharides into polymeric conjugates and their anti-influenza virus inhibitory potency, *J. Carbohydr. Chem.*, **19**, 1191–1200.
48. Lee, R.T., and Lee, Y.C. (1997) Facile synthesis of a high-affinity ligand for mammalian hepatic lectin containing three terminal N-acetylglucosamine residues, *Bioconjug. Chem.*, **8**, 762–765.
49. Henry, S.M. (2005) Engineering the surface of red cells with synthetic glycolipids (KODE CAE) to create ABO analytical sensitivity controls and xeno-modified cells, *Xenotransplantation*, **12**, 356.
50. Nollert, P., Kiefer, H., and Jahnig, F. (1995) Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces, *Biophys. J.*, **69**, 1447–1455.
51. Henry, S. (2014) Chapter 5. Rapid biofunctionalization of magnetic beads with function-spacer-lipid constructs, in *Magnetic bead coatings: today and tomorrow*, SepMag eBook (<http://sepmag.eu/free-guide-magnetic-bead-coatings>).
52. Henry, S., Korchagina, E., Tuzikov, A., and Bovin, N.V. (2010) Glyco-landscaping with neo glycolipid constructs, *Glycobiology*, **20**, 1472.
53. Cremer, P.S., and Boxer, S.G. (1999) Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass support, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2554–2559.
54. Richter, R., Mukhopadhyay, A., and Brisson, A. (2003) Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study, *Biophys. J.*, **85**, 3035–3047.
55. Radler, J., Strey, H., and Sackmann, E. (1995) Phenomenology and kinetics of lipid bilayers spreading on hydrophilic surfaces, *Langmuir*, **11**, 4539–4548.
56. Whiles, J.A., Deems, R., Vold, R.R., and Dennis, E.A. (2002) Bicelles in structure-function studies of membrane-associated proteins, *Bioorg. Chem.*, **30**, 431–442.
57. Hadac, E.M., Federspiel, M.J., Chernyy, E., Tuzikov, A., Korchagina, E., Bovin, N.V., Russell, S., and Henry, S.M. (2011) Fluorescein and radiolabeled function-spacer-lipid constructs allow for simple *in vitro* and *in vivo* bioimaging of enveloped virions, *J. Virol. Methods*, **176**, 78–84.

SYNTHETIC GLYCOLIPID-LIKE CONSTRUCTS AS TOOLS FOR GLYCOBIOLOGY RESEARCH, DIAGNOSTICS, AND AS POTENTIAL THERAPEUTICS

E. Y. Korchagina¹, S. M. Henry^{2*}

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow 117997, Russia;
E-mail: korchagina@carb.ibch.ru, ellyu@yandex.ru

² Auckland University of Technology, Biotech Innovation Centre, School of Engineering, Faculty of Design and Creative Technologies, Private Bag 92006, Auckland, 1142, New Zealand; E-mail: shenry@aut.ac.nz

Received March 24, 2015

Revision received April 14, 2015

Function-spacer-lipid (FSL) constructs are amphiphilic molecules that can disperse in water and then self-assemble into cell membranes or onto solid surfaces. Modification of a biological or non-biological surface is very easy and achieved by simple contact of the surface with an appropriately buffered solution containing one or more FSL. When the functional head group of the FSL is a glycan, glycan modified surfaces can be rapidly formed. Once cells, viruses, or solid surfaces are FSL modified with either simple or complex glycans, they can be used *in vitro* and/or *in vivo* to measure interactions with cells, viruses, antibodies, and lectins. FSLs have already been used in a variety of techniques ranging from antibody specificity mapping, antibody/toxin neutralization, diagnostic assays, immune system manipulation, and animal modeling of transfusion reactions. FSLs offer the easiest and fastest method available to achieve a glycan modified surface.

Key words: function–spacer–lipid, KODE technology, kodecyte, neoglycolipid