

Хмелевская К.С.*, Казловский И.С., Зинченко А.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Международный государственный экологический институт им. А.Д.Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь*

Препаративный способ получения цикло-ди-АМФ

Введение. Основной целью вакцинации является формирование эффективного иммунного ответа, который в состоянии защищать человека или животных от инфекционных патогенов. Живые ослабленные вакцины стимулируют иммунную систему путем репликации живых организмов, не вызывая клинического заболевания. Однако они в состоянии вызвать болезни у людей с ослабленным иммунитетом. Более безопасный подход к вакцинации основан на использовании инактивированных организмов или их фрагментов. Однако, очищенные антигены являются слабыми иммуногенами и, поэтому, требуют совместного применения с т.н. адъювантами.

Вакцинные адъюванты представляют собой вещества, которые в состоянии стимулировать иммунную систему, не проявляя при этом самостоятельной антигенности [1–3]. Следует отметить, что адъюванты очень важны не только для адекватной стимуляции иммунной системы, но и они также позволяют уменьшать дозу антигена, ускорять процесс формирования защитного иммунитета, стимулировать долгосрочную память и модулировать качество ответа согласно определенным клиническим потребностям.

В 1990-х иммунологи нашли, что болезнетворные микроорганизмы могут распознаваться организмом человека и животных с помощью определенных молекулярных датчиков, реагирующих на попадание в организм «чужих молекулярных образований». Чужими в данном случае являются такие молекулы

вирусов и бактерий, которые не встречаются в организме человека и животных. Эти молекулы распознаются как «сигналы опасности» особыми рецепторами, инициирующими цепь биохимических событий, приводящих к мобилизации врожденного и адаптивного иммунитета на защиту от возникшей опасности. Это указало направление поиска соединений с адьювантной активностью.

Одними из самых последних соединений, для которых показана адьювантная активность, являются циклические динуклеотиды, которые являются повсеместными прокариотическими внутриклеточными сигнальными молекулами.

Анализ литературы свидетельствует о целесообразности разработки вакцинных адьювантов на основе циклических динуклеотидов, получаемых не только химическим, но и биотехнологическим путем. Принимая во внимание то обстоятельство, что входными воротами возбудителей инфекционных заболеваний служат слизистые оболочки человека и животных, идеальным вакцинным адьювантом может служить цикло-ди-АМФ, поскольку именно этот динуклеотид наиболее выразительно активирует мукозальный иммунитет [4, 5].

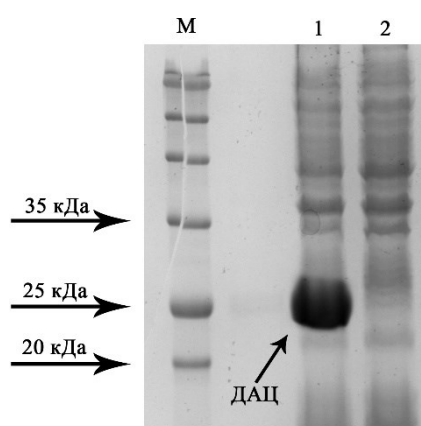
Принимая во внимание изложенное выше, целью настоящего исследования было оптимизировать процесс ферментативного синтеза цикло-ди-АМФ [6] для получения его в препаративных количествах.

Результаты исследования. Первый этап включал наработку и очистку фермента из ранее созданного генно-инженерного штамма *Escherichia coli* pet42-btDisA – продуцента диаденилатциклазы (ДАЦ) [6].

Анализ белкового состава клеток штамма-продуцента при помощи ДСН-полиакриламидного гель-электрофореза (рис. 1) показал, что основная часть целевого белка находится в нерастворимой фракции клеточного лизата, т.е. продуцируется в форме телец включения.

При этом расчетная продуцирующая способность используемого штамма увеличилась с 3,84 мкмоль/мин·л [6] до 330,75 мкмоль/мин·л культуральной жидкости.

Согласно электрофорезу в денатурирующем полиакриламидном геле, полученный препарат содержит 70% ДАЦ.



М – положение и молекулярные массы (кДа) стандартных белков.

Рис. 1 – Электрофореграмма белкового состава тельца включения (1) и супернатанта (2) лизата клеток штамма *E. coli* pVtdac

На втором этапе был оптимизирован препаративный синтез цикло-ди-АМФ, чей выход достиг 65%, который превысил ранее полученные литературные результаты [6, 7].

Для определения условий, в которых тельца включения проявляют максимальную активность, были изучены некоторые их физико-химические свойства. При изучении термостабильности было выявлено, что фермент в тельцах включения проявляет наибольшую активность при 55 °С.

Оптимальным значением pH для проявления активности ДАЦ в тельцах включения оказалось 7,5, однако было обнаружено, что использование буферов с более высокими значениями pH в диапазоне от 9,0–10,0 увеличивает количество активного белка, получаемого в процессе его очистки.

Литература:

1. Ebensen, T. Immune modulators with defined molecular targets: cornerstone to optimize rational vaccine design / T. Ebensen, C.A. Guzman // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2009. – Vol. 655. – P. 171–188. DOI: 10.1007/978-1-4419-1132-2_13
2. Coffman, R.L. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work / R.L. Coffman, A. Sher, R.A. Seder // *Immunity.* – 2010. – Vol. 33. – P. 492–503.

3. Ribeiro, C.M. Immunology of vaccine adjuvants / C.M. Ribeiro, V.E. Schijns // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 626. – P. 1–14.

4. Mucosal administration of cycle-di-nucleotide-adjuvanted virosomes efficiently induces protection against influenza H5N1 in mice / T. Ebensen [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8.:1223.

5. Genetic engineering of *Lactococcus lactis* co-producing antigen and the mucosal adjuvant 3' 5'- cyclic di adenosine monophosphate (c-di-AMP) as a design strategy to develop a mucosal vaccine prototype / I. Quintana [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9.:2100.

6. Казловский, И.С. Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента диаденилатциклазы и ее использование для синтеза цикло-ди-АМФ / И.С. Казловский [и др.] // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2015. – № 4. – С. 51–55.

7. Highly efficient enzymatic preparation of c-di-AMP using the diadenylate cyclase DisA from *Bacillus thuringiensis* / C. Zheng [et al.] // *Enzyme Microbiol. Technol.* – 2013. – Vol. 52, № 6–7. – P. 319–324.