

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКОГО 3',5'-ДИГУАНИЛАТА И ЕГО АНАЛОГОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ

Щеколова А.С.<sup>1</sup>, Рымко А.Н.<sup>1</sup>, Квач С.В.<sup>1</sup>, Зинченко А.И.<sup>1</sup>, Акалович С.Т.<sup>2</sup>, Пундик А.Н.<sup>2</sup>, Дорошенко Т.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Купревича, 2; e-mail: [zinch@mbio.bas-net.by](mailto:zinch@mbio.bas-net.by)

<sup>2</sup>РНИЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, 220053, Долгиновский тракт, 160; e-mail: [dor\\_t\\_m@mail.ru](mailto:dor_t_m@mail.ru)

Циклический 3',5'-дигуанилат (цикло-диГМФ) является внутриклеточным вторичным посредником бактерий, отвечающим за регуляцию основных процессов их жизнедеятельности. Недавние исследования показали, что цикло-диГМФ, а также его природные и модифицированные аналоги способны стимулировать иммунную систему позвоночных и могут быть использованы в качестве терапевтического средства для лечения инфекционных, онкологических и ряда других заболеваний, а также выступать в качестве адъювантов для вакцин.

С расширением исследований, направленных на изучение иммуномодулирующих свойств цикло-диГМФ и его аналогов, возрастает и потребность в синтезе препаративных количеств данных циклических динуклеотидов. В настоящее время их в основном получают химическим способом, недостатками которого являются сложность, дороговизна и небольшой выход целевого продукта. В литературе описан способ ферментативного получения цикло-диГМФ с использованием бактериального фермента дигуанилатциклазы (ДГЦ), представляющий собой одностадийный процесс конденсации двух молекул гуанозин-5'-трифосфата (ГТФ) с образованием целевого продукта. Преимущества такого способа производства заключаются в его относительной простоте и эффективности; кроме того, синтез проходит без использования специального оборудования и дорогостоящих и токсичных реагентов. Однако, несмотря на все преимущества, к настоящему времени ферментативный синтез аналогов цикло-диГМФ в научной литературе не описан.

Таким образом, актуальным является разработка ферментативного способа получения цикло-диГМФ и его аналогов, а также изучение иммуностимулирующих свойств этих соединений, что и явилось целью настоящего исследования.

**Методы исследования.** Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* – продуцент ДГЦ *Thermotogamaritima* (GeneID: 897742) сконструирован в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси. Культивирование клеток, индукцию синтеза целевого белка, а также его выделение и очистку проводили, как описано ранее [1].

Синтез циклических динуклеотидов проводили в реакционной смеси, содержащей (мМ): хлорид магния – 5,0; хлорид натрия – 250,0; глицин-NaOH (pH 10,0) – 50,0; нуклеозидтрифосфат (НТФ) – 1,0 с добавлением 2,5 мкМ ДГЦ. Реакцию инкубировали в течение 1 ч (для цикло-диГМФ) и 16 ч (для цикло-ди-араГМФ и цикло-ди-дезоксигМФ) при температуре 60 °С и перемешивании. Протекание реакции синтеза целевых соединений контролировали с помощью ионообменной ВЭЖХ.

Очистку циклических динуклеотидов проводили с использованием ионообменной хроматографии на смоле Dowex 1×2 с последующим обессоливанием образцов методом нанофильтрации с применением ультрафильтрационной установки Amikon 8050 Ultrafiltration Stirred Cell («Millipore», США).

Структуру полученных циклических динуклеотидов подтверждали методами УФ-спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а также данными масс-спектрометрии.

Для оценки иммуномодулирующих свойств полученных циклических динуклеотидов использовали легко воспроизводимый *invitro* метод активации цельной крови человека (whole blood assay) [2]. Определение фактора некроза опухолей- $\alpha$  (ФНО) и интерлейкина-8 в образцах плазмы активированной крови проводили методом иммуноферментного анализа по методикам разработанным в РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий и описанным ранее [3].

**Результаты исследований.** В результате выполнения работы впервые продемонстрирована возможность ферментативного синтеза фармакологически перспективных аналогов цикло-диГМФ – неопisanного в литературе цикло-ди-араГМФ и цикло-ди-дезоксигМФ, который ранее получали только химически.

На основании полученных данных разработана эффективная технология ферментативного получения указанных соединений, включающая трансформацию соответствующего НТФ в целевой циклический динуклеотид с последующей его очисткой с помощью ионообменной хроматографии и обессоливания методом нанофильтрации.

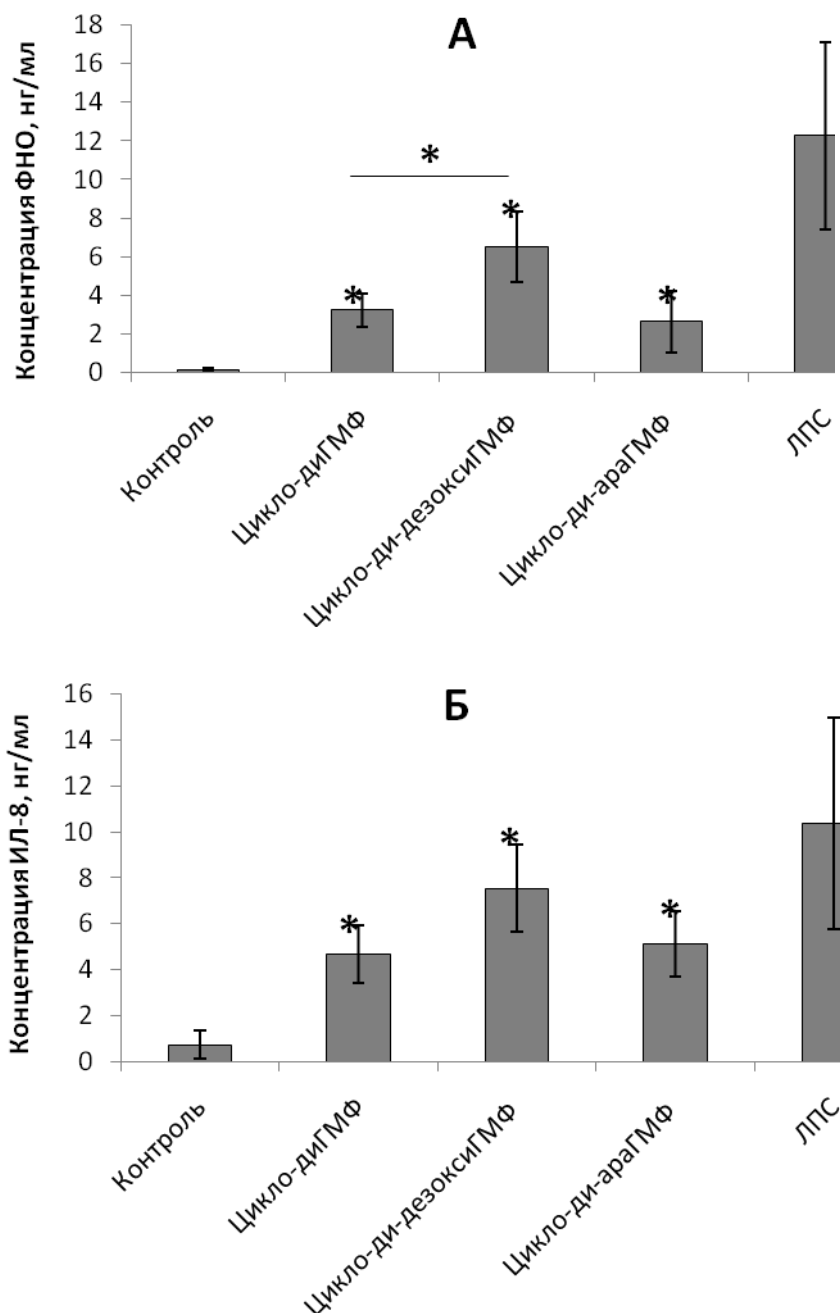
Согласно разработанной технологической схеме наработаны образцы циклических динуклеотидов. После всех стадий очистки количество препарата цикло-диГМФ, полученного из 500 мг ГТФ, составило около 280 мг. Из 100 мг араГТФ и дезоксиГТФ получили около 55 мг цикло-ди-араГМФ и 50 мг цикло-ди-дезоксигМФ, соответственно. Выходы целевых продуктов после всех этапов очистки составили 75–80 % в расчете на затраченные НТФ.

Соответствие полученных соединений целевым продуктам подтверждали с помощью аналитической ВЭЖХ, используя в качестве стандартного образца коммерческий препарат цикло-диГМФ («Biolog», Германия), а также методами УФ-спектроскопии, и масс-спектрометрии. Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод о том, что синтезированные в настоящем исследовании соединения действительно являются цикло-диГМФ, цикло-ди-араГМФ и цикло-ди-дезоксигМФ. Нарботанные образцы циклических динуклеотидов являются хроматографически чистыми (содержание основного соединения превышает 98 %) и пригодны для дальнейшего исследования их биологической активности.

На сегодняшний день в экспериментах *invitro* и *invivo* показано, что цикло-диГМФ обладает мощными иммуностимулирующими и иммуномодулирующими свойствами, проявляет свою активность на разных типах эукариотических клеток, вызывает изменение экспрессии цитокинов, хемокинов и их рецепторов и рассматривается в качестве потенциального адьюванта при вакцинации. Чтобы оценить иммуномодулирующие свойства полученных циклических динуклеотидов, мы изучили их влияние на продукцию ФНО, основного провоспалительного цитокина, и ИЛ-8, мощного хемоаттрактанта нейтрофилов, клетками крови человека. Цикло-диГМФ, цикло-ди-дезоксигМФ и цикло-ди-араГМФ добавляли в концентрации 50 микроМ в цельную гепаринизированную кровь и инкубировали при +37°С при периодическом перемешивании. После 4 часов инкубации пробирки центрифугировали (10 мин, 400g), плазму собирали и хранили при -20°С. Отрицательным контролем служило соответствующее разведение деионизованной воды, которая использовалась для приготовления наработанных образцов, положительным контролем – липополисахарид *Escherichiacoli* («Sigma») 1,5 мкг/мл. Как видно из представленных на рисунке результатов, все препараты циклических динуклеотидов способны стимулировать продукцию ФНО и ИЛ-8 в крови человека. Необходимо отметить, что полученный цикло-ди-дезоксигМФ обладает более мощным иммуностимулирующим действием по сравнению с цикло-диГМФ, известным своими иммуномодулирующими свойствами [4].

**Заключение.** В результате выполнения работы впервые продемонстрирована возможность ферментативного синтеза перспективных аналогов цикло-диГМФ – цикло-ди-араГМФ и цикло-ди-дезоксигМФ. Разработана эффективная технология ферментативного получения указанных циклических динуклеотидов с выходом целевых продуктов 75–80 %. Нарботаны образцы цикло-диГМФ, цикло-ди-араГМФ и цикло-ди-дезоксигМФ, пригодные

для исследования их биологической активности. Показано, что в цельной крови человека цикло-ди-дезоксигМФ обладает наиболее мощным иммуностимулирующим действием.



**Рисунок – Влияние циклических динуклеотидов на продукцию ФНО (А) и ИЛ-8 (Б) в цельной крови человека.** Представлены средние значения результатов, полученных в трех независимых экспериментах. \* –  $p < 0,05$ .

#### Литература

1. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase /A.S. Korovashkina [et al.] // J. Biotechnol. – 2012. – Vol. 164, N 2. – P. 276–280.
2. A whole blood in vitro cytokine release assay with aqueous monoclonal antibody presentation for the prediction of therapeutic protein induced cytokine release syndrome in humans /B. Wolf [et al.] // Cytokine. – 2012/ – Vol. 60. – P. 828-837.

3. TNF receptor p55 and IL-8<sub>72</sub> and IL-8<sub>77</sub> isoforms: blood and urine levels in breast cancer patients / V.P. Shichkin [et al.] // J. Immunotoxicol. – 2009. – Vol. 6. – P. 235-242.
4. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule / D.K.R. Karaolis [et al.] // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 2171–2181.

**Enzymatic synthesis of Cyclic 3',5'-diguanylate and its analogues and study of their immunostimulatory properties**

Shchokolova A.S.<sup>1</sup>, Rymko A.N.<sup>1</sup>, Kvach S.V.<sup>1</sup>, Zinchenko A.I.<sup>1</sup>, Akalovich S.T.<sup>2</sup>, Pundik A.N.<sup>2</sup>, Doroshenko T.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Belarus; e-mail: zinch@mbio.bas-net.by*

<sup>2</sup> *The Republic Research & Production Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, 220053, Minsk, Dolginovsky tract, 160; e-mail: dor\_t\_m@mail.ru*

**Abstract**

Substrate specificity of recombinant full-length diguanylatecyclase (DGC) of *Thermotogamaritima* with mutant allosteric site has been investigated. It has been originally shown that the enzyme could use the GTP closest analogs, deoxyguanosinetriphosphate and arabinofuranyl-guanosine triphosphate, as substrates. The possibility of enzymatic synthesis of cyclic deoxyguanosine 3',5'-monophosphate (c-di-dGMP) and previously unknown cyclic arabinofuranyl-guanosine 3',5'-monophosphate (c-di-araGMP) using DGC of *T. maritima* in the form of inclusion bodies has been demonstrated firstly. In addition, c-di-GMP and its analogues were shown to have immunostimulatory properties. They enhanced production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-8 in a whole blood assay. C-di-dGMP has been shown to possess the strongest immunostimulating activity among its analogs.