

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ЦИАНИЛИРОВАНИЯ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА *NEISSERIA MENINGITIDIS* СЕРОГРУППЫ Y В ТЕХНОЛОГИИ КОНЬЮГИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН

Уметалиева А. Т.<sup>1</sup>

Научные руководители – канд. биол. наук Хасаншина З. Р.<sup>1</sup>, Белянкин А. А.  
руководитель департамента Разработки бактериальных препаратов

<sup>1</sup>Университет ИТМО

aumetalieva2004@gmail.com

Работа выполнена в рамках темы ВКР «Определение уровня цианилирования капсульных полисахаридов бактерий в ходе химического синтеза конъюгатов».

### Введение

Инфекции, вызываемые инкапсулированными бактериями, остаются значимой проблемой здравоохранения. Их основными антигенами являются капсульные полисахариды, которые в нативной форме индуцируют Т-независимый иммунный ответ и не формируют иммунологическую память у новорожденных [1]. Конъюгация полисахарида с белковым носителем переводит иммунный ответ в Т-зависимый и обеспечивает формирование иммунологической памяти [1,2]. Важным этапом получения конъюгированных вакцин является активация полисахарида с образованием реакционноспособных функциональных групп, обеспечивающих последующую конъюгацию с белком. Одним из широко применяемых методов является цианилирование гидроксильных групп полисахарида с образованием цианоэфирных групп [3]. Они способны вступать в реакцию с нуклеофильными соединениями, такими как адипиновый дигидразид (ADH). Количественная оценка степени активации полисахарида является важным параметром, определяющим эффективность последующей конъюгации. В этой работе для определения степени активации использовали адипиновый дигидразид и 2,4,6-тринитробензосульфоновую кислоту, образующие окрашенный комплекс [4]. Измерение оптической плотности позволяет рассчитать количество реакционноспособных групп, используемые для последующей конъюгации с белком. Целью работы является количественная оценка влияния pH на степень активации капсульного полисахарида *Neisseria Meningitidis* серогруппы Y методом TNBS с подтверждением образования производных полисахарида гель-фильтрационной ВЭЖХ (эксклюзионной хроматографией).

### Основная часть

В качестве объекта исследования использовали капсульный полисахарид *Neisseria meningitidis* серогруппы Y. Активацию проводили методом цианилирования в диапазоне pH 8,0-10,0 (шаг 0,5) с последующей конъюгацией с ADH. Одна из NH<sub>2</sub>-групп ADH связывается с активированным полисахаридом, вторая реагирует с TNBS с образованием окрашенного комплекса, количество которого определяли спектрофотометрически. Установлено, что повышение pH среды активации сопровождается увеличением степени модификации. Концентрация окрашенных комплексов возрастала почти вдвое с 5,852 мкг/мл (при pH 8,0) до 10,186 мкг/мл (при pH 10,0). Полученные данные свидетельствуют о прямой зависимости степени цианилирования от щелочности среды и подтверждают, что увеличение pH способствует более интенсивному образованию реакционноспособных цианоэфирных групп. Увеличение числа активированных групп может обеспечивать более высокую реакционную способность к конъюгации с белковым носителем. Таким образом,

варьирование рН активации позволяет регулировать уровень функционализации полисахарида и оптимизировать условия получения конъюгированных вакцин. Конъюгаты анализировали методом эксклюзионной ВЭЖХ, что позволило выявить изменение молекулярно-массового распределения и подтвердить образование конъюгатов. При более высоких значениях рН возрастала интенсивность раннего пика, соответствующего конъюгату.

Таким образом, сравнение результатов двух методов подтверждает, что повышение рН среды активации приводит к увеличению степени цианилирования и последующей модификации полисахарида адипиновым дигидразидом.

### **Выводы и практическое использование результатов**

Повышение рН среды активации сопровождается увеличением степени активации полисахарида, что подтверждено результатами TNBS-анализа и ВЭЖХ. Метод TNBS позволяет проводить прямую количественную оценку уровня введенных реакционноспособных групп, а ВЭЖХ подтверждает изменение молекулярных характеристик модифицированного полисахарида. Полученные результаты могут быть использованы при разработке и оптимизации технологий конъюгированных вакцин для контроля степени активации полисахарида перед конъюгацией с белковым носителем. Подход применим в лабораторной практике и технологическом контроле для обеспечения воспроизводимости и стабильности процессов получения полисахарид-белковых конъюгатов.

### **Литература**

1. Sadarangani M. Protection Against Invasive Infections in Children Caused by Encapsulated Bacteria. *Front Immunol.* 2018 Nov 20;9:2674. doi: 10.3389/fimmu.2018.02674. PMID: 30515161; PMCID: PMC6255856.
2. Centers for Disease Control and Prevention. (2021). *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases* (14th ed., E. Hall, A. P. Wodi, J. Hamborsky, V. Morelli, & S. Schillie, Eds.). Public Health Foundation.
3. Lees A, Zhou J. Activation and Conjugation of Soluble Polysaccharides using 1-Cyano-4-Dimethylaminopyridine Tetrafluoroborate (CDAP). *J Vis Exp.* 2021 Jun 14;(172). doi: 10.3791/62597. Erratum in: *J Vis Exp.* 2021 Jul 9;(173). doi: 10.3791/6470. PMID: 34180904.
4. Qi X.-Y. Spectrophotometric determination of hydrazine, hydrazides, and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid / X.-Y. Qi, N.O. Keyhani, Y.C. Lee – Text : direct // *Analytical Biochemistry.* 1988. Vol. 175. № 1. – P. 139-144.