**Научно-образовательный курс**

**"Технология аффинной очистки генетических вакцин, полученных на основе рекомбинантного аденовирусного вектора с генетически модифицированным капсидным белком IX"**

Авторы: Гарас М.Н.

к.б.н. Рогожин В.Н.

к.б.н. Тутыхина И.Л.

**Краткое описание курса**

В курсе рассматриваются этапы аффинной очистки аденовирусных векторов, несущих на поверхности капсида различные субстрат-связывающие домены в составе капсидного белка IX, для производства готовых препаратов генетических вакцин на основе аденовирусов.

**Существующие методы очистки рекомбинантных аденовирусов. Их преимущества и недостатки.**

В связи с широким использованием векторов на основе аденовирусов (Ад) в научной практике и медицинских исследованиях, в настоящее время активно создаются GLP и GMP производства для получения препаративных количеств Ад. В этой связи особенно актуальной является не только задача конструирования и получения рекомбинантных Ад, но и разработка эффективных методов концентрирования и очистки Ад.

Существующие сегодня способы очистки аденовирусов обладают некоторыми недостатками. Так например, в результате очистки аденовируса путем его осаждения на поверхность раствора CsCl плотностью 1,375 г/см3 ультрацентрифугированием получается препарат, содержащийся в высокомолярном растворе хлористого цезия, являющемся токсичным продуктом, несовместимым для применения животным и человеку.

В определенной степени преодолеть этот недостаток позволяет использование ионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии и/или ультрафильтрации. Однако такой способ очистки имеет несколько недостатков. Во-первых, данный метод очистки является многоступенчатым и, как следствие, трудоемким. Во-вторых, исходный клеточный лизат, содержащий аденовирус, не может быть непосредственно нанесен на хроматографическую колонку по причине потери ею функциональности вследствие «забивки» большим количеством клеточных балластных белков. В-третьих, процесс ультрафильтрации, сам по себе, также не может быть отдельно использован для очистки аденовирусного препарата из клеточного лизата, так как процесс ультрафильтрации не является абсолютным и не позволяет полностью освободиться от массы балластных белков. И, наконец, в-четвертых, в связи с многостадийностью такого способа очистки, возможны существенные потери аденовирусного материала на выходе.

В этой связи, наиболее простым в отношении процесса очистки вируса из клеточного лизата является способ, позволяющий непосредственно использовать вируссодержащий лизат клеток для очистки аденовирионов и получать чистый препарат аденовируса на выходе. В частности, известен способ очистки капсид-модифицированных аденовирусов методом аффинной хроматографии на сорбенте, где в качестве активной фазы выступает мономерный авидин с сорбированным на нем биотином. В этом случае, в качестве очищаемого аденовирус, к капсидному белку IX которого генетически привязаны биотин-связывающие пептиды (BAP), способные специфически взаимодействовать с биотин-авидиновым носителем. Однако недостатками предложенного способа являются: необходимость предварительного активирования и регенерации сорбента, высокое соотношение объема вируссодержащего лизата клеток и объема ресуспендированного носителя, длительная подготовка клеточного вируссодержащего материала. Кроме того, после цикла очистки аденовирус оказывается связанным с биотином через модифицированный pIX, что препятствует дальнейшей модификации аденовектора путем нагрузки его капсида (через взаимодействие с BAP) различными целевыми лигандами (бактериальные антигены, антитела против маркерных клеточных рецепторов) для использования векторов как наноносителей антигенов для вакцинации или для направленной трансдукции капсид-модифицированными аденовирусами определенных типов клеток человека и животных.

В данном отношении наиболее перспективным способом очистки является аффинная хроматография аденовекторов с модифицированным pIX, несущим на С-конце молекулы углевод-связывающих доменов гликозилгидролаз. В качестве сорбента для таких pIX-модифицированных векторов могут выступать полисахаридные носители, которые не требуют предварительной процедуры подготовки, что существенно упрощает технологию и делает её более дешевой, в связи с низкой себестоимостью самого носителя и отсутствием необходимости использовать дополнительные реагенты для активирования и регенерации носителя. Элюирование модифицированных аденовекторов возможно путем добавления буферов с низкими значениями pH, но не повреждающими структуру аденовирионов, в течение короткого промежутка времени. Получаемый на выходе аденовирус, содержащий свободные углевод-связывающие домены, может быть затем модифицирован различными лигандами, конъюгированными с соответствующими углеводными фрагментами, способными связываться с УСД на поверхности аденовируса.

Рассмотрим этапы аффинной очистки pIX-модифицированных аденовекторов на примере рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа несущего на поверхности капсида целлюлозо-связывающие домены с применением в качестве сорбента аморфной целлюлозы.

**Этапы аффинной очистки аденовирусных векторов, несущих на поверхности капсида целлюлозо-связывающие домены в составе pIX**

**I. Подготовка вируссодержащего материала.**

Подготовку вируссодержащего материала осуществляют стандартным способом, включающим следующие процедуры.

***1. Накопление рекомбинантного капсид-модифицированного аденовируса в клетках.***

Для накопления рекомбинантного капсид-модифицированного аденовируса с целлюлозо-связывающими доменами в структуре капсидного белка IX, затравкой данного вируса заражают клетки линии 293-HEK, высеянные на тридцать 150-мм культуральных чашек с конфлюэнтностью монослоя 90% в дозе 15 инфекционных вирусных частиц на клетку. На вторые сутки после заражения должно наблюдаться цитопатическое действие (ЦПД) вируса у 100% клеток.

***1.2. Сбор зараженных клеток.***

После наступления ЦПД клетки собирают в центрифужные банки (V=200 мл) и центрифугируют для осаждения клеток при 1500 об/мин в течение 10 минут, а супернатант удаляют. Осадок клеток ресуспендируют в 10 мл фосфатного солевого буфера (PBS).

***1.3. Лизис клеток для высвобождения рекомбинантного капсид-модифицированного аденовируса.***

Клетки в полученной суспензии лизируют путем трехкратного перемораживания для высвобождения рекомбинантного капсид-модифицированного аденовируса из клеток.

***1.4. Освобождение от клеточного дебриса.***

Клеточные лизаты после трехкратного перемораживания центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 минут для осаждения клеточного дебриса, а супернатант, содержащий рекомбинантный капсид-модифицированный аденовирус, отбирают для его последующей очистки.

**II. Проведение очистки рекомбинантного капсид-модифицированного аденовируса** **с целлюлозо-связывающими доменами на целлюлозном носителе.**

***2.1. Посадка рекомбинантного капсид-модифицированного аденовируса на аморфную целлюлозу.***

В качестве носителя для очистки рекомбинантного капсид-модифицированного аденовируса используется раствор аморфной целлюлозы (приготовленный по методу А.Е. Гурвича). Носитель смешивается с приготовленной вируссодержащей суспензией в соотношении: 1 г целлюлозного носителя и 9 мл вируссодержащей суспензии. Смесь инкубируется в течение 12 часов при постоянном покачивании при температуре +4°С.

***2.2. Осаждение целлюлозного носителя с рекомбинантным капсид-модифицированным аденовирусом.***

Целлюлозный носитель с адсорбированным на нем рекомбинантным капсид-модифицированным аденовирусом осаждается центрифугированием при 4000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант удаляется.

***2.3. Промывка.***

а) Сначала осадок аморфной целлюлозы с рекомбинантным капсид-модифицированным аденовирусом промывается нейтральным трис-фосфатным буфером pH=7,2 в объеме 10 мл, а затем снова осаждается центрифугированием 4000 об/мин в течение 5 минут с последующим удалением супернатанта, как описано в этапе *2*. Промывка повторяется 2 раза.

б) Для окончательной отмывки целлюлозного носителя с рекомбинантным капсид-модифицированным аденовирусом от связавшихся с ним балластных веществ (белки, нуклеиновые кислоты, гликопротеиды и т.д.) целлюлозный носитель с аденовирусом промывается кислым трис-фосфатным буфером pH=4,5 в объеме 8 мл. Целлюлозный носитель с рекомбинантным капсид-модифицированным аденовирусом затем осаждается и супернатант удаляется, как в этапе *2.2*.

***2.4. Элюирование рекомбинантного капсид-модифицированного аденовируса.***

Для элюирования рекомбинантного капсид-модифицированного аденовируса с целлюлозного носителя добавляется кислый элюирующий трис-фосфатный буфер (pH=3,0) в объеме 3,5 мл и инкубируется в течение 30 минут при постоянном покачивании при +4°С.

***2.5. Отбор вируссодержащего раствора.***

Для разделения целлюлозного носителя и элюированного аденовируса Ad5EGFP-pIX-CBD суспензию центрифугируют, как описано в этапе *3.2*, а затем отбирают вируссодержащий супернатант.

***2.6. Нейтрализация.***

Так как в отобранном вируссодержащем супернатанте pH среды равен 3,0, рекомбинантный капсид-модифицированный аденовирус не может сохраняться в нем длительное время. Для предотвращения разрушения элюированного аденовируса раствор нейтрализуют путем добавления карбонатного буфера (pH=9,2) до выравнивания pH до значения 7,2.

*Материалы разработаны при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамкам реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (Соглашение № 8779)*

**Список используемых источников:**

1. Blanche F., Barbot A., Cameron B. Method of separating viral particles. // United States Patent. 2003. N. US 6537793 B2.
2. Campos S.K., Parrott M.B., Barry M.A. Avidin-based targeting and purification of a protein IX-modified, metabolically biotinylated adenoviral vector. // Mol. Ther. 2004. V. 9. P. 942–954.
3. Green K.Y., Wold W.S.M. Human adenoviruses: growth, purification and transfection assay. // Methods Enzymology. 1980. V. 80. P. 425-431.
4. Tang J. C-T., Vellecamp G., Bondoc L.L. Methods for purifying viruses. // United States Patent. 2001. N. US 6261823 В1.