



### Растворы для очистки

Бюллетень 6807

#### Решение задач по расшифровке больших сложных вирусов

Число методов лечения, основанных на генной терапии, значительно выросло с тех пор, как они впервые появились почти три десятилетия назад. Это породило глубокий оптимизм в отношении нашего потенциала в разработке лекарства от таких болезней, как рак и СПИД. Одним из наиболее эффективных факторов успеха генной терапии является способность использовать вирусы в качестве транспортных средств для доставки генов к их целям. Первоначально для этой цели были задействованы ретровирусы мышей, но в последнее время аденовирус (Ad) и адено-ассоциированный вирус (AAV) все чаще выбираются для этого. Необходимо отметить, что исследования Ad и AAV составляют более 25% всех текущих исследований генной терапии. Однако производство достаточного количества клинически чистого вируса, необходимого для обеспечения биобезопасности, является непростой задачей.

Одним из главных препятствий для достижения высоких степеней очистки является размер и сложная структура аденовируса. Одна целая частица вируса содержит более 2700 белковых субъединиц, имеет массу ~165 МДа и диаметр ~0,1 мкм. Эта сложная структура служит причиной неэффективности традиционных методов очистки вирусов, таких как фильтрация, градиенты плотности и ультрацентрифугирование. Кроме того, вирус имеет тысячи вариантов заряда, что затрудняет установление четко определенных условий связывания и элюирования. Поэтому протоколы и стратегии очистки, используемые для малых и средних вирусов, также не подходят для работы с аденовирусами. Кроме того, аденовирусы могут быть кислотно-неустойчивыми, что еще больше увеличивает проблемы очистки. Все эти препятствия требуют поиска альтернативных стратегий для достижения эффективной аденовирусной очистки. Однако, в последние два десятилетия появилась и приобрела популярность технология колоночной хроматографии, ставшая способом преодоления трудностей в процессе аденовирусной очистки и ограничений традиционных методов очистки (Nuyghe et al. 1995).

Компания Bio-Rad уже более 50 лет реализует постоянно совершенствуемый спектр хроматографических смол для очистки вирусов в промышленных количествах. После скрининга пяти различных хроматографических смол нами была разработана двухколоночная стратегия захвата и очистки рекомбинантного аденовируса, готового к использованию цГМФ. Мы утверждаем, что данный процесс позволяет получать активный концентрированный продукт с чистотой, белком из клетки-хозяина (НСР) и уровнем загрязнения ДНК, сопоставимыми с клинической чистотой других продуктов. Кроме того, технология легко масштабируется и достаточно проста, быстра и эффективна для использования в производстве клинически чистых вирусных векторов для лечения на основе генной терапии. В данном руководстве представлен краткий обзор различных смол, причины выбора последних двух образцов и результаты нашего исследования.

#### План эксперимента по процессу очистки аденовирусов

Первичный скрининг пяти смол компании Bio-Rad

Первоначально были исследованы четыре ионообменные (IEX) и одна смешанная (MM) смолы, чтобы определить, какие из них могут быть использованы для массового захвата аденовирусов. Как показано в Таблице 1, при использовании двух катионообменных смол (CEX), **UNOsphere™S** и **Nuvia™S** большая часть вируса оставалась в проточных и/или промытых образцах. Это делает их непригодными как для связывания и элюирования, так и для проточных методов, особенно по сравнению с тремя другими смолами - **Nuvia™ cPrime™**, **UNOsphere™ Q** и **Nuvia™ Q**, использование которых привело к тому, что большая часть вируса осталась в элюате. Nuvia cPrime – это смола смешанного типа,

отличающаяся своим уникальным балансом между гидрофобными характеристиками и характеристиками заряда. Она выполнена на основе механически и химически стабильной, жесткой, макропористой базовой матрицы с размером частиц, оптимизированным для обеспечения исключительных свойств текучести, быстрого переноса массы и высокой стабильности (бюллетень 6242). Как Nuvia Q, так и UNOsphere Q являются анионообменными смолами (AEX). Смола Nuvia Q, обладающая высокой связывающей способностью, обеспечивает отличную производительность при полировке. Она позволяет значительно повысить производительность при одновременном снижении капитальных затрат, требований к пространству и времени цикла при последующей очистке (бюллетень 6129).

Смола UNOsphere Q имеет поры большого диаметра и большую площадь поверхности, что позволяет максимизировать скорость захвата, емкость, извлечение и производительность макромолекул (бюллетень 2724). Она отличается высокой связывающей способностью 125-180 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA) при скорости потока 150-1200 см/час.

Таблица 1. Результаты первоначального исследования смол.

Колоночный тип	Вирус в промывочных/ проточных образцах	Вирус в элюате	Примечания
UNOsphere S (CEX)	+++	++	Признана неподходящей для очистки вирусов как при связывании и элюировании, так и для проточных методов
Nuvia S (CEX)	+++	++	Признана неподходящей для очистки вирусов как при связывании и элюировании, так и для проточных методов
Nuvia cPrime (MM)	—	++++	Частичное элюирование в 125 мМоль NaCl, pH 6.5; требуется растворение неочищенного материала перед загрузкой в колонку
UNOsphere Q (AEX)	—	++++	Можно рассматривать при прямом массовом захвате
Nuvia Q (AEX)	—	++++	Можно рассматривать при прямом массовом захвате

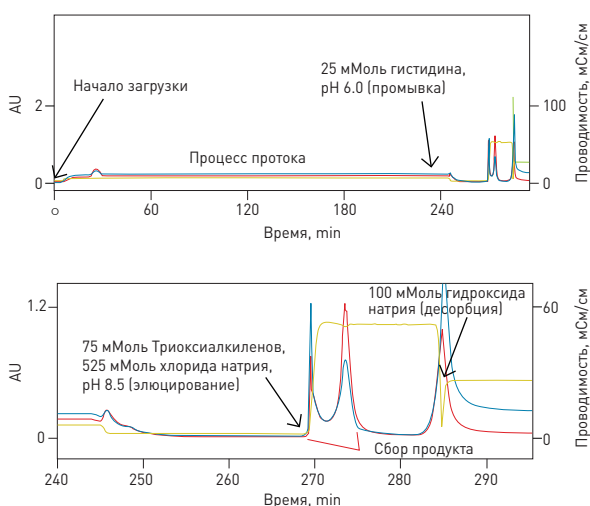


Рисунок 1. Репрезентативная хроматограмма этапа массового захвата при помощи Nuvia cPrime. ОП 260 (—); ОП 280 (—); проводимость (—). AU- единицы оптической плотности.

### Выбор смолы для массового захвата

Из трех смол, потенциально пригодных для использования в процессе массового захвата, Nuvia cPrime была выбрана по указанным ниже причинам. Основной предполагаемой примесью в образцах является сывороточный альбумин. Nuvia Q и UNOsphere Q связывают альбумин, тем самым снижая эффективную связывающую способность вируса. Однако, Nuvia Q также связывает ДНК клетки-хозяина и другие отрицательно заряженные примеси, например липополисахариды, что помешало рассматривать возможность их применения на этапе массового захвата. С другой стороны, при работе с Nuvia cPrime альбумин и отрицательно заряженные примеси выводятся в потоке. Кроме того, использование Nuvia cPrime требует наличие колонки меньшего размера, что снижает вероятность ее загрязнения. Таким образом, Nuvia cPrime была признана наиболее подходящей для выполнения этапа массового захвата. Репрезентативная хроматограмма этого эксперимента показана на Рисунке 1

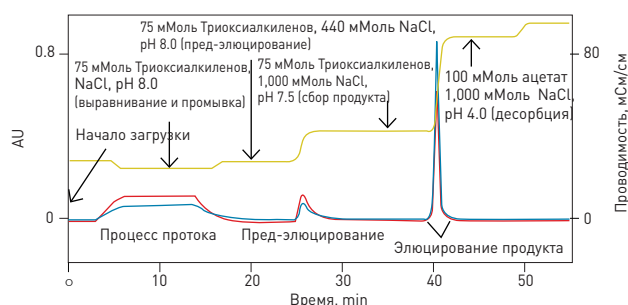


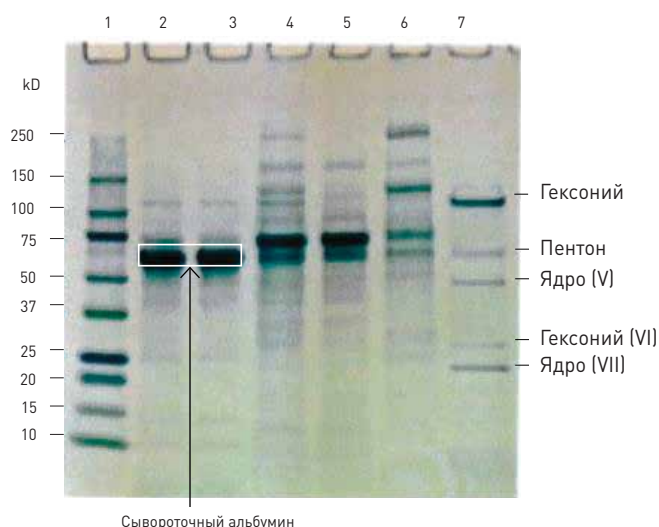
Рисунок 2. Репрезентативная хроматограмма полировочного этапа очистки при помощи Nuvia Q. ОП 260 (—); ОП 280 (—); проводимость (—). AU- единицы оптической плотности.

### Выбор смолы для полировки

Элюат смолы Nuvia cPrime со стадии захвата имел концентрацию NaCl ~500 мМ, что позволило выделить смолу Nuvia Q, как наиболее подходящую для использования на полировочной стадии очистки. Репрезентативная хроматограмма данного эксперимента показана на Рисунке 2.

### Результаты

Начальная очистка захвата рекомбинантного аденовируса с помощью Nuvia cPrime привела к десятикратному сокращению объема обработки и значительному снижению содержания загрязняющих веществ в исходном потоке (Рисунок 3, полосы 2-4). На заключительном этапе полировочной очистки с помощью Nuvia Q было достигнуто дополнительное двукратное уменьшение объема продукта наряду со значительным улучшением его чистоты (Рисунок 3, полосы 4-7). Пять самых известных вирусных белков: гексон, пентон, коровий белок капсида аденовируса (V), гексон (VI), и коровий белок капсида аденовируса (VII) отчетливо видны в очищенном конечном продукте (Рисунок 3, дорожка 7), тогда как невирусные белки, по существу, отсутствуют.



**Рисунок 3.** Анализ промежуточных стадий и конечного продукта методом ДНС-ПААГ-электрофореза. Дорожка 1 - маркер молярной массы; дорожка 2 - загрузка Nuvia cPrime; дорожка 3 - процесс протока Nuvia cPrime; дорожка 4 - элюирование Nuvia cPrime/загрузка Nuvia Q; дорожка 5 - процесс протока Nuvia Q; дорожка 6 - пред-элюирование Nuvia Q; дорожка 7 - конечный продукт.

Данный процесс дает активный, концентрированный вирусный продукт с уровнем чистоты, НСР и ДНК, сопоставимыми с другими клинически чистыми продуктами (Таблица 2), являясь при этом менее трудоемким и времязатратным, чем другие методы очистки.

**Таблица 2.** Восстановление частиц вируса и уровень примесей

Образец	Общее число вируса (x10 <sup>11</sup> частицы)	Уровень примесей (нг/10 <sup>10</sup> частицы)	
		ДНК	НСР
Необработанный материал	30,6	3,144	н/д
Материал, обработанный нуклеазой	31,8	30	3,022
Элюат Nuvia cPrime	18,4	н/о	58
Элюат Nuvia Q	16,4	<0,02	2

н/о, не определено.

Смолы, участвующие в каждом этапе процесса очистки, как и условия их использования, должны быть оптимизированы в зависимости от источника аденовируса. При необходимости очистки таких мелких и средних вирусов, как вирус денге, полиовирус или вирус японского энцефалита, идеально подойдет другая смола смешанного типа-керамический гидроксипатит СНТ™. Подробности вирусной очистки с ее помощью описаны в бюллетенях 6790 и 6549.

Надеемся, что информация, представленная в данном бюллетене, поможет вам в работе над вашей стратегией очистки аденовирусов.

Для получения технической поддержки/информации о продуктах или для запроса ценового предложения обратитесь к своему региональному представителю компании Bio-Rad по адресу: process@bio-rad.com или в нашу службу поддержки клиентов по телефону 1-800-4-BIORAD (1-800-424-6723).

Список источников  
Huyghe BG et al. (1995). Очистка рекомбинантного аденовируса типа 5, кодирующего р53 человека, методом колоночной хроматографии. Hum Gene Ther 6, 1403-1416.

Изучите наш огромный ассортимент промышленных хроматографических смол, их эксплуатационные характеристики и применение (бюллетень 6713), а также запросите образец продукции для изучения.

**BIO-RAD****Bio-Rad Laboratories, Inc.****Life Science Group**

Веб сайт bio-rad.com США 1 800 424 6723 Австралия 61 2 9914 2800 Австрия 43 1 877 89 01 177 Бельгия 32 (0)3 710 53 00 Бразилия 55 11 3065 7550 Канада 1 905 364 3435 Китай 86 21 6169 8500 Чехия 420 241 430 532 Дания 45 44 52 10 00 Финляндия 358 09 804 22 00 Франция 33 01 47 95 69 65 Германия 49 89 31 884 0 Гонг Конг 852 2789 3300 Венгрия 36 1 459 6100 Индия 91 124 4029300 Израиль 972 03 963 6050 Италия 39 02 216091 Япония 81 3 6361 7000 Корея 82 2 3473 4460 Мексика 52 555 488 7670 Нидерланды 31 (0)318 540 666 Новая Зеландия 64 9 415 2280 Норвегия 47 23 38 41 30 Польша 48 22 331 99 99 Португалия 351 21 472 7700 Россия 7 495 721 14 04 Сингапур 65 6415 3188 ЮАР 27 (0) 861 246 723 Испания 34 91 590 5200 Швеция 46 08 555 12700 Швейцария 41 026 674 55 05 Тайвань 886 2 2578 7189 Тайланд 66 662 651 8311 ОАЭ 971 4 8187300 Великобритания 44 020 8328 2000

**helicon**

121374, г. Москва,  
Кутузовский пр., д. 88  
Тел.: +7 (499) 705-50-50  
info@helicon.ru



**8 800 770 71 21**  
**helicon.ru**

**ФИЛИАЛЫ:****ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ:**

630090 г. Новосибирск,  
ул. Инженерная, д. 28  
Тел.: +7 (383) 207-84-85  
novosibirsk@helicon.ru

**ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ:**

195220 г. Санкт-Петербург,  
ул. Гжатская, д. 22, корп. 1  
Тел.: +7 (812) 244-85-52  
spb@helicon.ru

**ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО В ПРИВОЛЖСКОМ РЕГИОНЕ:**

420021 г. Казань,  
ул. Татарстан, д. 14/59, оф. 201  
Тел.: +7 (843) 202-33-37  
volga@helicon.ru

**ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО В ЮЖНОМ РЕГИОНЕ:**

344116 г. Ростов-на-Дону,  
ул. 2-ая Володарская, д. 76/23а  
Тел.: +7 (863) 209-88-89  
rostov@helicon.ru