

УДК 578.226:60-7:602.641

ОЧИСТКА АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА DJ МЕТОДОМ АНИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ

© 2023 г. Д. В. Глазкова¹ *, Е. А. Михайлюк¹, Г. А. Шипулин¹, Е. В. Богословская¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью” Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119121 Россия

*e-mail: georgin2702@gmail.com

Поступила в редакцию 26.06.2023 г.

После доработки 20.08.2023 г.

Принята к публикации 07.09.2023 г.

Векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) — это эффективный инструмент для доставки генов. Уже зарегистрировано несколько генотерапевтических препаратов на базе AAV, и исследования в этой области продолжаются. Со временем появляются новые перспективные варианты AAV-векторов с измененным капсидом, к которым относится и AAV-DJ. Для внедрения новых векторов в клиническую практику необходимо разрабатывать технологию их производства, в том числе этапа очистки. Наиболее перспективным методом, позволяющим масштабировать производство вектора, считается хроматографическая очистка. Однако условия хроматографии необходимо оптимизировать для конкретного капсида AAV. Нами разработан метод очистки вектора AAV-DJ с помощью анионообменной хроматографии и проведено сравнение качества получаемого продукта и его выхода с вектором AAV-DJ, полученным классическим методом ультрацентрифугирования в градиенте йодиксанола.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирус DJ, вирусный вектор, анионообменная хроматография, инфекционный титр, примесные белки, йодиксанол, ультрацентрифугирование

DOI: 10.56304/S023427582304004X

Векторы, созданные на основе аденоассоциированного вируса (adeno-associated virus, AAV), зарекомендовали себя как безопасные и эффективные для генной терапии. На сегодняшний день уже несколько генотерапевтических препаратов на базе AAV одобрены и применяются в клинической практике. Среди них Luxturna® (Spark Therapeutics Inc., США) для лечения амавроза Лебера, Zolgensma® (Novartis Gene Therapies, Inc., США) для лечения спинальной мышечной атрофии, Roctavian™ (BioMarin Pharmaceutical Inc., США) для лечения гемофилии А и Hemgenix® (CSL Behring LLC, Австралия) для лечения гемофилии В (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>). В настоящее время идут клинические испытания ряда AAV-векторов с целью их использования для лечения различных заболеваний [1, 2].

Список сокращений: АОХ — анионообменная хроматография; ИОХ — ионообменная хроматография; ПЭГ — полиэтиленгликоль; УЦ — ультрацентрифугирование; AAV — аденоассоциированный вирус; TU (transducing units) — трансдукционные единицы; vg (vector genome) — векторный геном.

Наряду с использованием уже известных серотипов AAV, ведется разработка векторов с модифицированными капсидами — для повышения эффективности переноса, снижения вероятности развития иммунной реакции и/или обеспечения целевой доставки генов. Часто новые AAV создают с использованием биоинформатических и генно-инженерных подходов, таких как рациональный дизайн и направленная эволюция [3].

Еще в 2008 г. Grimm и соавт. [4] описали получение модифицированного капсида AAV-DJ. Авторы сконструировали библиотеку химерных капсидов AAV, состоящих из перетасованных случайным образом участков капсидов AAV серотипов 1, 2, 3, 7, 8 и 9. Нарботанную с использованием этой библиотеки смесь из химерных AAV пассировали на перевиваемой линии клеток печени в присутствии иммуноглобулинов, полученных из пула сывороток человека. В результате произошел отбор капсида AAV-DJ, тропного к клеткам печени и не подверженного нейтрализации антителами человека. Было показано, что в его состав вошли только фрагменты капсидов AAV-2, -8 и -9. В нескольких работах продемонстрировано, что при внутривенном введении AAV-DJ обеспечивает высокоэффективный и специфиче-

ский перенос генов в печень мышей *in vivo* [4–7]. В дальнейшем обнаружили, что капсид AAV-DJ эффективно доставляет гены и в другие типы клеток *in vitro* или *in vivo* при локальном введении, что позволяет считать его перспективным инструментом для применения в генной терапии [5, 8–11].

Для применения вектора в генной терапии необходимо наладить его масштабируемое производство, одним из важных этапов которого является очистка. Такие широко используемые методы, как ультрацентрифугирование (УЦ) в градиенте йодиксанола или CsCl, хотя и дают высокую степень очистки, но не подлежат масштабированию. В ряде работ описана очистка AAV-DJ методом аффинной хроматографии с использованием гепарина [7, 12, 13], но не приведены данные по эффективности и выходу целевого продукта. Широко используемая для других AAV-капсидов коммерчески доступная аффинная хроматография на AVB-сефарозе оказалась неэффективной в случае AAV-DJ [14, 15], хотя недавно была использована в работах Н. Zhao с соавт. [16] и Е. Рябовой с соавт. [17] – без анализа выхода и чистоты получаемых частиц. Несмотря на высокую гомологию AAV-DJ и AAV-8, попытка провести очистку на еще одной коммерчески доступной аффинной смоле, POROS™ CaptureSelect™ AAV8 (Thermo Fisher Scientific Inc., США), предназначенной для очистки AAV8, не увенчалась успехом [18].

К перспективным методам очистки AAV-капсидов относится ионнообменная хроматография (ИОХ), использование которой позволяет не только избавиться от белковых примесей, но и разделить пустые (не содержащие ДНК) и полные капсиды (содержащие ДНК) [19–21]. ИОХ успешно используется для очистки AAV разных серотипов [19, 22–24]. Следует заметить, что условия проведения ИОХ приходится подбирать для каждого типа капсида – в силу их значительных различий по физико-химическим свойствам. На сегодняшний день в литературе нет описания условий очистки AAV-DJ методом ИОХ. Не совсем удачный пример использования ИОХ для очистки AAV-DJ/8 (вариант AAV-DJ, в котором гепаринсвязывающий домен замещен гомологичной последовательностью из AAV-8) приведен в статье J. Guan и др. [25]: выход целевого продукта составил <10% от исходного количества частиц при низкой степени очистки.

Задача проведенного нами исследования заключалась в подборе условий очистки AAV-DJ методом ИОХ и в сравнении характеристик полученного продукта с таковыми для AAV-DJ, полученного традиционным способом – УЦ в градиенте йодиксанола.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клеточные линии

Эмбриональные клетки почки человека HEK-293FT (Thermo Fisher Scientific Inc.) культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; HyClone, США), 4 mM L-глутамин (Gibco, США), 1 mM пируват натрия (Gibco), 1% заменимых аминокислот MEM NEAA 100× (Gibco), стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл соответственно (Gibco). Клетки фибросаркомы человека линии HT-1080 (Коллекция культур клеток позвоночных Института цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия) растили на среде MEM, содержащей 10% FBS, 1% заменимых аминокислот MEM NEAA 100× (Gibco), стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл соответственно (Gibco).

Наработка AAV-DJ-GFP

Адгезионную клеточную линию HEK-293FT засеивали в культуральные флаконы площадью 150 см² (TPP, Швейцария) при 37°C и 5% CO₂. За сутки до трансфекции клетки HEK-293FT пересевали в двухуровневые культуральные флаконы CellStack площадью 1272 см² (Corning, США) в количестве 14 × 10⁷ клеток на культуральный флакон (~80% конfluence) и инкубировали в тех же условиях.

Для трансфекции клеток HEK-293FT использовали три плазмидные конструкции: pAAV-Helper, pAAV-RC-DJ и pAAV-GFP (Cell Biolabs, США) в соотношении 1 : 1 : 1. Трансфекцию проводили с использованием раствора линейного полиэтиленimina гидрохлорида (PEI MAX, MW 40000; Polyscience Inc., США) в концентрации 1 г/л. Смесь для трансфекции содержала PEI : ДНК в соотношении 3 мкл : 1 мкг в 150 mM NaCl. Время инкубации составило 10 мин. Трансфекционную смесь добавляли в культуральные флаконы с HEK-293FT из расчета 153 мкг плазмидной ДНК на один двухуровневый флакон CellStack (1272 см²). Через 24 ч после трансфекции ростовую среду меняли на бессывороточную OptiMEM Reduced Serum Medium (Gibco) и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 ч.

Подготовка осветленных клеточных лизатов

Через 72 ч после трансфекции проводили сбор частиц AAV-DJ-GFP. Клетки HEK-293FT снимали с поверхности культуральных флаконов и осаждали центрифугированием. Клетки, собранные с одного двухуровневого флакона CellStack, ресуспендировали в 6 мл буфера для лизиса следующего состава: 50 mM Трис-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂. Лизис клеток HEK-293FT проводи-

ли с помощью трех циклов замораживания/оттаивания. Клеточный лизат обрабатывали бензоназой в концентрации 50 ед/мл (Merck, Германия) при 37°C в течение 30 мин и осветляли центрифугированием при 2300 g в течение 10 мин. Полученный супернатант фильтровали через мембраны с размером пор 0.45 мкм (TRP) и готовили аликвоты объемом 0.8 мл.

Предварительная очистка AAV-DJ-GFP осаждением полиэтиленгликолем (ПЭГ)

К 1.6 мл осветленного лизата добавляли 0.4 мл 40%-ного ПЭГ-8000 (AppliChem, Германия) в 2.5 М NaCl и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После центрифугирования при 2300 g в течение 15 мин тщательно удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в 2 мл буфера, состав которого варьировали в зависимости от состава стартового буфера для хроматографической очистки: а) 25 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 2 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl, 0.01% Pluronic F-68; б) 25 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 2 мМ MgCl₂, 150 мМ NH₄OAc, 0.01% Pluronic F-68. Образцы инкубировали в буфере при 4°C в течение 18–24 ч. Нерастворимую фракцию осаждали центрифугированием при 2300 g в течение 10 мин, а супернатант, содержащий частицы AAV-DJ-GFP, направляли на дальнейшую очистку.

Очистка AAV-DJ-GFP в градиенте плотности йодиксанола

Очистку AAV в градиенте плотности йодиксанола проводили на основе протокола [26], оптимизированного для используемых нами условий УЦ. Осветленный лизат (1.6 мл) или суспензию очищенного ПЭГ-осаждением вектора (2 мл) доводили до объема 9 мл фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и заливали в 33-миллилитровые ультрацентрифужные пробирки Quick-Seal (Beckman Coulter, США). Для приготовления градиента йодиксанола использовали медицинский контрастирующий препарат Визипак® (GE Healthcare, США), содержащий 320 мг/мл йода, который разводили до концентраций 16.3, 36.6, 44.3 и 65.2% в буфере TD (ФСБ, 1 мМ MgCl₂, 2.5 мМ KCl). К раствору, содержащему 16.3% йодиксанола, добавляли NaCl до концентрации 1 М. Растворы последовательно вносили на дно пробирки под предыдущий раствор: 9 (16.3%), 6 (36.6%), 5 (44.3%) и 4 (65.2%) мл. УЦ проводили в центрифуге Optima XPN-100 (Beckman Coulter), используя ротор SW Ti32 при 175000 g и 18°C в течение 2 ч. По окончании процесса со дна ультрацентрифужной пробирки сначала отбирали 5 мл “пустой” фракции, а затем в отдельную пробирку 11 мл фракции, содержащей AAV-DJ-GFP.

Трехступенчатая очистка AAV-DJ-GFP с использованием ПЭГ-8000 и сульфата аммония

Очистку AAV-DJ-GFP выполняли в соответствии с протоколом, описанным ранее [27, 28]. На первом этапе к клеточному лизату добавляли 0.25 объема 40%-ного ПЭГ-8000 в 2.5 М NaCl, инкубировали при 4°C в течение 1 ч, центрифугировали при 2300 g в течение 15 мин и полученный осадок растворяли в буфере TNE (100 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 20 мМ EDTA). На втором этапе проводили экстракцию хлороформом в объемном соотношении 1 : 1. На третьем этапе использовали водную двухфазную систему ПЭГ-сульфат аммония: 10% ПЭГ-8000–13.2% (NH₄)₂SO₄.

Хроматографическая очистка AAV-DJ-GFP

Очистку AAV-DJ-GFP проводили методом анионообменной хроматографии (АОХ) в системе АКТА start, (Cytiva, Швеция) на хроматографической колонке C10/10 (Cytiva) с 5 мл сорбента Q Sepharose XL (Cytiva). Перед нанесением на колонку образец (1.6 мл осветленного клеточного лизата или 2 мл суспензии вектора после осаждения ПЭГ) предварительно разводили в 10 раз в буфере 25 мМ Трис-HCl, 2 мМ MgCl₂, 0.01% Pluronic F-68 (pH 8.0 в эксперименте с элюцией градиентом концентрации NaCl или pH 9.0 в экспериментах с элюцией NH₄OAc). Элюирование проводили линейным или ступенчатым градиентом концентрации NaCl или NH₄OAc. Скорость потока на протяжении всего хроматографического процесса составляла 1 мл/мин.

Диализ и концентрирование вектора

Полученные в результате проведенной разными способами очистки образцы AAV-DJ-GFP диализовали и концентрировали, для чего использовали центрифужные концентраторы 100 кДа Amicon Ultra-15 (Merck). Диализ проводили против ФСБ с 0.001% Pluronic F-68 (Gibco). Конечный объем образцов доводили до 0.5 мл и собирали, после чего мембрану промывали 0.25 мл ФСБ и объединяли с концентратом. Готовили аликвоты по 50–100 мкл и хранили при –80°C.

Определение инфекционного титра AAV-DJ-GFP

Культуру клеток фибросаркомы человека HT-1080 культивировали в среде MEM (Gibco), содержащей 10% FBS, заменимые аминокислоты, 10 мМ HEPES, пенициллин и стрептомицин. Клетки рассеивали в 24-луночный планшет в количестве 1 × 10⁵ клеток на лунку и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 4 ч – чтобы клетки прикрепилась к поверхности планшета. В среде OptiMEM готовили серию 5-кратных разведений

образцов, содержащих AAV-DJ-GFP, и добавляли в лунки по 125 мкл суспензии вектора. Через 48 ч клетки HT-1080 снимали с планшета и измеряли на проточном цитометре NovoCyte Quanteon (Agilent Technologies, США) процент GFP-положительных клеток. Титр рассчитывали по формуле: $TU/мл = a \times 10^5 d/V$, — где TU — трансдукционный титр; a — доля GFP⁺- клеток, 10^5 — общее число клеток в лунке, d — коэффициент разведения исходного образца вектора, V — объем суспензии вектора, добавленный в лунку.

Определение числа геномных копий вектора в препаратах AAV-DJ-GFP

Для определения числа копий векторных геномов AAV-DJ-GFP (vg/мл) в образцах использовали метод ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для этого выделяли ДНК из образца, используя набор реагентов АмплиТест РИБО-преп (ФГБУ “ЦСП” ФМБА России, Россия) согласно рекомендациям производителя. ПЦР-РВ проводили на приборе RotorGene Q (Qiagen, Нидерланды), используя праймеры и программу амплификации, описанные в работе [29].

Электрофоретический анализ образцов AAV-DJ-GFP

Содержание белковых примесей в полученных препаратах AAV-DJ-GFP оценивали электрофорезом в 10%-ом полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ). Гель окрашивали набором Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя.

Спектрофотометрический анализ образцов AAV-DJ-GFP

К образцам AAV-DJ-GFP добавляли 10% SDS до конечной концентрации 0.1% и инкубировали в течение 10 мин при 75°C. Определяли оптическую плотность полученного раствора при двух длинах волн: 260 и 280 нм (A_{260} и A_{280}) — на спектрофотометре NanoPhotometer NP80 Touch (IMPLEN, Германия) и рассчитывали соотношение A_{260}/A_{280} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор условий хроматографической очистки AAV-DJ-GFP

Для экспериментов по хроматографической очистке были наработаны частицы AAV-DJ-GFP в клетках НЕК-293FT и получен осветленный клеточный лизат. В одном раунде хроматографии использовали 1.6 мл осветленного лизата. Перед нанесением на колонку осветленный лизат, содер-

жащий частицы AAV-DJ-GFP, предварительно очищали осаждением ПЭГ. Этот этап позволяет снизить содержание белковых примесей в лизате. Кроме того, осадок векторных частиц, полученный под действием ПЭГ, может быть сразу переведен в буфер, используемый на следующем этапе очистки — для нанесения на колонку.

Ранее в статьях были описаны способы хроматографической очистки AAV серотипов 2 и 9 на Q Sepharose (Cytiva) [19, 30]. Учитывая данные по очистке AAV, приводимые в этих работах, в качестве стартовых параметров для хроматографии мы выбрали следующие условия: буфер для уравнивания, нанесения и отмывки — 25 мМ Трис-HCl, 2 мМ MgCl₂, 15 мМ NaCl, 0.01% Pluronic F-68, pH 8.0; объем хроматографического сорбента Q Sepharose XL (Cytiva) — 2 мл. Элюирование проводили линейным градиентом концентраций NaCl (15 → 1000 мМ) в 20 объемах сорбента. Полученные фракции анализировали на присутствие частиц AAV-DJ-GFP, определяя инфекционный титр.

В приведенных условиях не удалось добиться хорошего разделения хроматографических пиков (рис. 1а). В пике 1, который элюировался в диапазоне 100–150 мМ NaCl (фракция 1), содержалось 27% инфекционных частиц AAV-DJ-GFP (табл. 1). Еще 23.1% частиц выходило в начале пика 2, который, судя по высокому значению поглощения A_{280} , содержал много примесных белков. Таким образом, отделить вирусные частицы от примесей в этих условиях не удалось.

Для оптимизации условий хроматографической очистки были внесены следующие изменения: 1) в буфере для нанесения и отмывки NaCl заменили на NH₄OAc (на основании результатов, приведенных в работе [19], где ацетат аммония использован для АОХ-очистки AAV серотипа 2); 2) повысили pH буферного раствора с 8.0 до 9.0 (для более прочного связывания белков с хроматографическим сорбентом); 3) сузили диапазон линейного градиента, ограничив его 500 мМ NH₄OAc; 4) объем хроматографического сорбента увеличили до 5 мл, а элюирование проводили 15-кратным объемом относительно объема сорбента. Предложенный подход позволил повысить разрешение хроматографических пиков (рис. 1б).

В результате анализа титра AAV в полученных фракциях показано, что основная часть векторных частиц выходит с колонки в пике 1 (табл. 2). Выход AAV-DJ-GFP по общему инфекционному титру составил 45% от количества, нанесенного на колонку. Инфекционный титр AAV-DJ-GFP во фракциях “проскок” и “отмывка” был ниже предела обнаружения.

В связи с тем, что AAV-DJ-GFP выходит с колонки в самом начале градиента, для сокращения процесса хроматографической очистки было принято решение заменить градиентное элюирова-

Таблица 1. Выход целевого продукта, AAV-DJ-GFP, на всех этапах очистки при использовании линейного градиента концентраций NaCl в качестве элюента

Table 1. Yield of the target product, AAV-DJ-GFP, at all purification steps using a linear concentration gradient of NaCl as eluent

Образец	Число инфекционных частиц, TU	Выход-1 ^a , %	Выход-2 ^b , %
Осветленный лизат	4.12×10^9		100.00
ПЭГ	2.42×10^9	59.00	59.00
АОХ, фракция 1	1.11×10^9	46.00	27.00
АОХ, фракция 2	9.51×10^8	39.00	23.00
АОХ, фракция 3	1.57×10^8	6.20	3.80
АОХ, фракция 4	6.07×10^7	2.50	1.50
АОХ, фракция 5	3.12×10^7	1.30	0.76
АОХ, фракция 6	9.13×10^6	0.38	0.22
АОХ, фракция 7	4.77×10^6	0.20	0.12
АОХ, фракция 8	2.33×10^7	0.96	0.57

Примечание: Выход целевого продукта рассчитан по отношению к предыдущему этапу (^a) и по отношению к исходному содержанию вектора (^b).

Note: The yield of the target product was calculated relative to the previous step (^a) and relative to the initial vector content (^b).

Таблица 2. Выход AAV-DJ-GFP на всех этапах очистки при использовании линейного градиента концентраций NH₄OAc в качестве элюента

Table 2. Yield of AAV-DJ-GFP at all purification steps using a linear concentration gradient of NH₄OAc as eluent

Образец	Число инфекционных частиц, TU	Выход-1 ^a , %	Выход-2 ^b , %
Осветленный лизат	1.84×10^{10}	100.0	100.0
ПЭГ	1.38×10^{10}	75.0	75.0
Пик 1	6.14×10^9	45.0	33.0
Пик 2	6.77×10^8	4.9	3.7
Пик 3	2.05×10^8	1.5	1.1
Пик 4	1.43×10^8	1.0	0.8
После диализа	5.74×10^9	93.0	31.0

Примечание: Выход целевого продукта рассчитан по отношению к предыдущему этапу (^a) и по отношению к исходному содержанию вектора (^b).

Note: The yield of the target product was calculated relative to the previous step (^a) and relative to the initial vector content (^b).

ние на ступенчатое. По хроматограмме, представленной на рис. 1b, определили, что максимум первого хроматографического пика, содержащего фракцию AAV-DJ-GFP, соответствует кондуктивности 11.8 мСм/см, или 150 мМ NH₄OAc, поэтому на следующем этапе подбора условий АОХ элюирование проводили в несколько ступеней, используя 150, 200, 300 и 500 мМ NH₄OAc. Объем буфера на каждой ступени варьировали в диапазоне от 3 до 5 объемов сорбента. Фракции, соответствующие хроматографическим пикам (рис. 1c), объединяли и измеряли в них инфекционный титр AAV-DJ-GFP (табл. 3). Выход векторных ча-

стиц, оцениваемый по инфекционному титру, в пике 1 составил 51% от нанесенных на колонку.

Кроме того, нами была проведена очистка AAV-DJ-GFP с помощью АОХ с использованием линейного градиента NH₄OAc без предварительной очистки осаждением ПЭГ. В этом случае мы ожидали, во-первых, сокращения времени проведения процедуры очистки и, во-вторых, снижения потерь целевого продукта, неизбежных на предварительном этапе. По сравнению с предварительно осажденным ПЭГ образцом хроматографический пик, соответствующий AAV-DJ-GFP, был менее выражен, а его высота была в 2 раза вы-

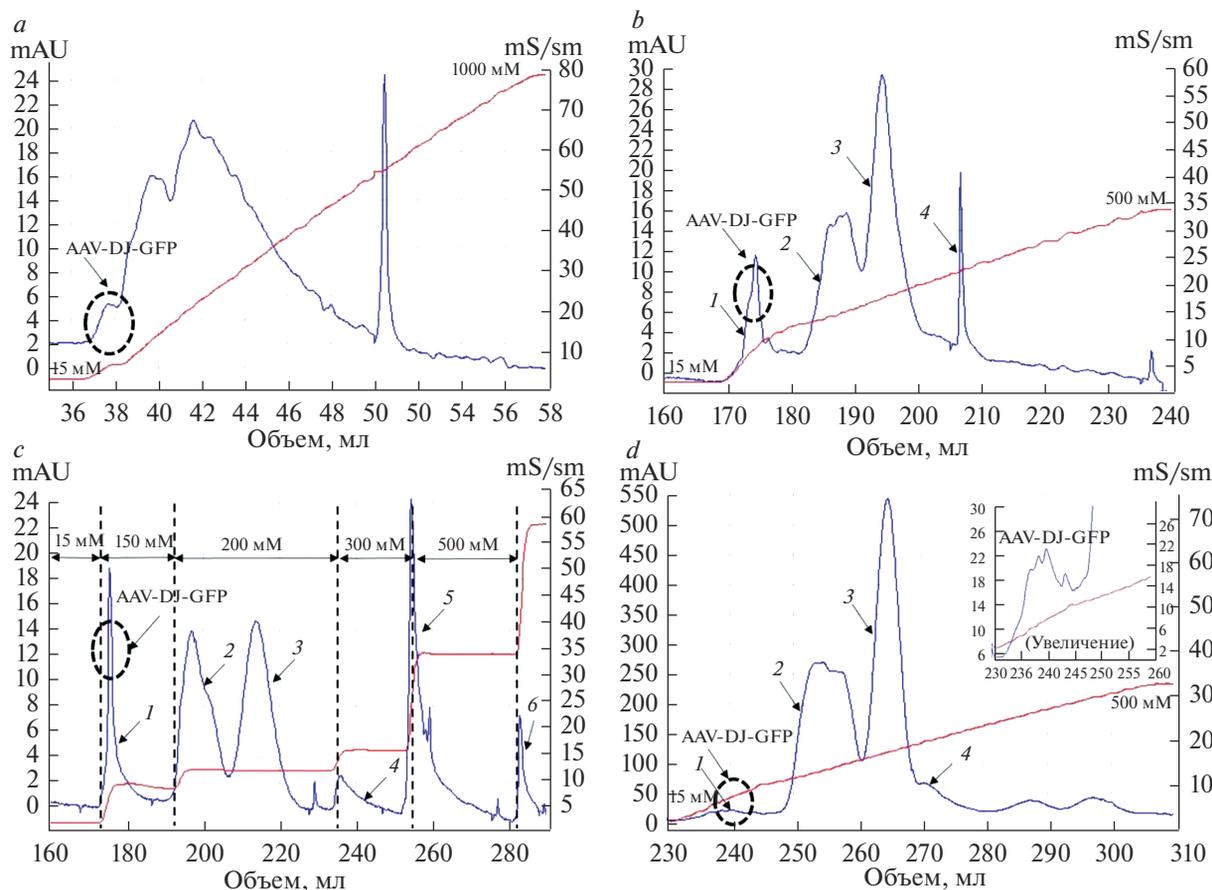


Рис. 1. Подбор условий хроматографической очистки AAV-DJ-GFP на анионообменной смоле Q Sepharose XL (Cytiva). *a* – ПЭГ → АОХ (линейный градиент концентраций NaCl (15–500 мМ), pH 8.0, объем хроматографического сорбента – 2 мл); *b* – ПЭГ → АОХ (линейный градиент концентраций NH₄OAc (15–500 мМ), pH 9.0, объем хроматографического сорбента – 5 мл); *c* – ПЭГ → АОХ (ступенчатый градиент NH₄OAc: 150, 200, 300 и 500 мМ, pH 9.0, 5 мл сорбента); *d* – АОХ AAV-DJ-GFP-содержащего осветленного клеточного лизата (линейный градиент концентраций NH₄OAc (15–500 мМ), pH 9.0, 5 мл сорбента). По оси ординат указаны значения A₂₈₀.

Fig. 1. Selection of optimal conditions for chromatographic purification of AAV-DJ-GFP on anion exchange resin Q Sepharose XL (Cytiva). *a* – PEG → anion exchange chromatography (AEC; linear gradient of NaCl concentrations (15–500 mM), pH 8.0; volume of chromatographic sorbent – 2 ml); *b* – PEG → AEC (linear gradient of NH₄OAc concentrations (15–500 mM), pH 9.0; 5 ml of the sorbent); *c* – PEG → AEC (step gradient of NH₄OAc concentrations: 150, 200, 300 and 500 mM, pH 9.0; 5 ml of the sorbent); *d* – AEC of AAV-DJ-GFP-containing clarified cell lysate (linear gradient of NH₄OAc concentrations (15–500 mM), pH 9.0; 5 ml of the sorbent). The Y-axis shows the values of A₂₈₀.

ше (рис. 1*d*). Это значит, что содержание примесей в целевой фракции больше, чем в случае использования предварительно очищенного образца. В то же время выход вектора действительно был выше и составил 58% от нанесенного на колонку (табл. 4).

Количественная и качественная оценка препаратов AAV-DJ-GFP, полученных при использовании разных методов очистки

На следующем этапе мы провели сравнение таких параметров, как выход и чистота частиц AAV-DJ-GFP, получаемых при использовании разных протоколов АОХ. Качество препаратов, очищенных АОХ, сравнивали с полученными с

использованием “золотого стандарта” – градиента йодиксанола, – а также с качеством препарата после трехступенчатой очистки с помощью ПЭГ-8000 и сульфата аммония [28]. Кроме того, в сравнение включили вариант очистки, при котором УЦ в градиенте йодиксанола проводили после предварительного осаждения ПЭГ. Такой способ позволяет увеличить производительность УЦ – в одном раунде проводить очистку значительно большего числа вирусных частиц.

Степень очистки целевого продукта

Оценку чистоты препаратов AAV-DJ-GFP, полученных по разным протоколам, проводили методом электрофореза в SDS-ПААГ с окрашива-

Таблица 3. Выход AAV-DJ-GFP на всех этапах очистки при использовании ступенчатого градиента концентрации NH₄OAc в качестве элюента**Table 3.** Yield of AAV-DJ-GFP at all purification steps using a step concentration gradient of NH₄OAc as eluent

Образец	Число инфекционных частиц, TU	Выход-1 ^a , %	Выход-2 ^b , %
Осветленный лизат	2.21×10^{10}	100.0	100.0
ПЭГ	1.94×10^{10}	88.0	88.0
Пик 1	9.84×10^9	51.0	45.0
Пик 2	6.00×10^8	3.1	2.7
Пик 3	2.41×10^9	12	11.0
Пик 4	2.80×10^8	1.4	1.3
Пик 5	3.40×10^8	1.8	1.5
Пик 6	4.55×10^8	2.3	2.1
После диализа	4.58×10^9	47.0	21.0

Примечание: Выход целевого продукта рассчитан по отношению к предыдущему этапу (^a) и по отношению к исходному содержанию вектора (^b).

Note: The yield of the target product was calculated relative to the previous step (^a) and relative to the initial vector content (^b).

Таблица 4. Выход AAV-DJ-GFP на всех этапах очистки при использовании линейного градиента концентрации NH₄OAc без предварительного осаждения ПЭГ**Table 4.** Yield of AAV-DJ-GFP at all purification steps using a linear NH₄OAc concentration gradient without PEG precipitation

Образец	Число инфекционных частиц, TU	Выход-1 ^a , %	Выход-2 ^b , %
Осветленный лизат	1.89×10^{10}	100.0	100.0
Пик 1	1.09×10^{10}	58.0	58.0
Пик 2	4.15×10^9	22.0	22.0
Пик 3	8.16×10^8	4.3	4.3
Пик 4	2.76×10^8	1.5	1.5
После диализа	3.07×10^9	28.0	16.0

Примечание: Выход целевого продукта рассчитан по отношению к предыдущему этапу (^a) и по отношению к исходному содержанию вектора (^b).

Note: The yield of the target product was calculated relative to the previous step (^a) and relative to the initial vector content (^b).

нием серебром. Образцы с AAV-DJ-GFP анализировали до и после последнего этапа, общего для всех вариантов очистки – концентрирования и диализа на центрифужных концентраторах Amicon Ultra-15 100 кДа. Анализ до и после использования фильтров Amicon Ultra проводили с целью оценки вклада этого этапа в очистку. На рис. 2 приведена электрофореграмма с образцами до диализа на Amicon Ultra-15.

Капсидные белки VP1, VP2 и VP3 AAV-DJ имеют примерные размеры 87, 72 и 62 кДа и присутствуют в капсиде в молярном соотношении 1 : 1 : 10. На электрофореграмме, представленной на рис. 2, можно видеть полосу, соответствующую капсидному белку VP3, однако количества белков VP1 и VP2 недостаточно для четкой визуализации (рис. 2).

Как видно из электрофореграммы, меньше всего примесных белков присутствует в препаратах AAV-DJ-GFP, при очистке которых использовали УЦ: ПЭГ → йодиксанол и йодиксанол (рис. 2, дорожки 2 и 3 соответственно), – затем по степени чистоты следуют препараты после очистки АОХ с предварительным осаждением ПЭГ (дорожки 4 и 5). Самое большое содержание примесных белков клетки-хозяина обнаружено в препаратах AAV-DJ-GFP, полученных трехступенчатой очисткой ПЭГ и сульфатом аммония (дорожка 1), а также после АОХ осветленного лизата (дорожка 6).

Для электрофоретического анализа препаратов AAV-DJ-GFP после диализа на Amicon Ultra-15 на дорожки геля наносили на порядок больше вирусных частиц, чем при анализе образцов “до

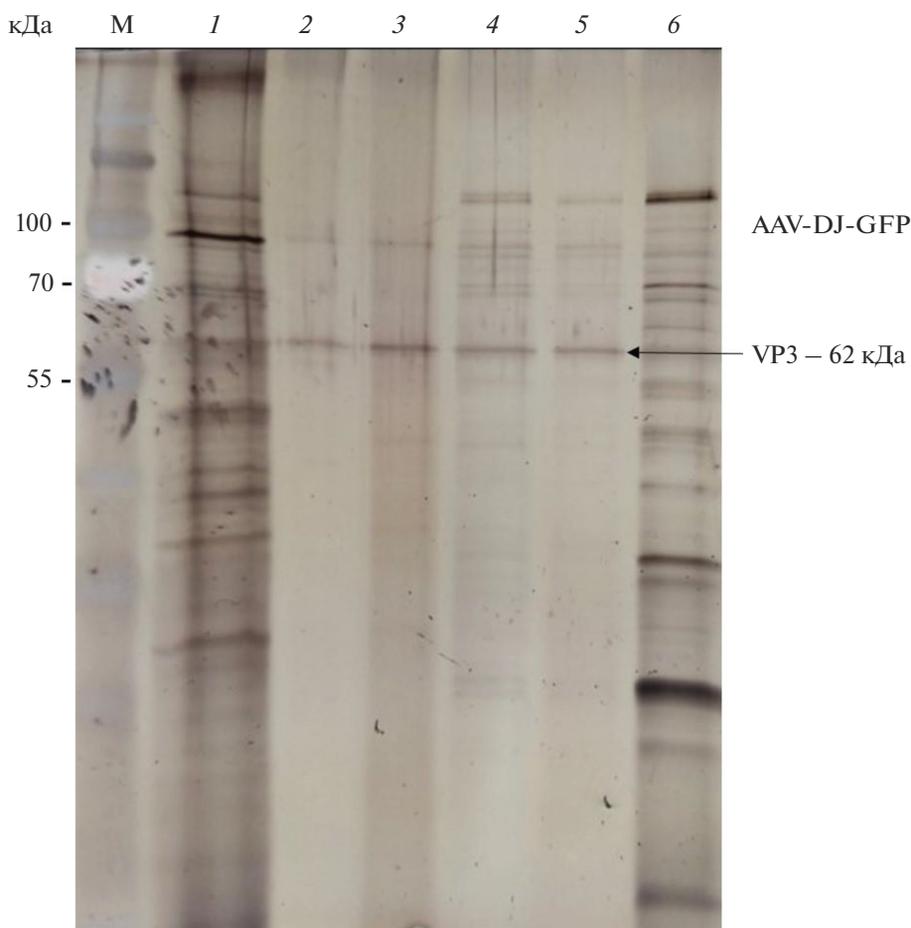


Рис. 2. Электрофоретический анализ образцов AAV-DJ-GFP до концентрирования и диализа. На дорожки 10%-ного SDS-ПААГ нанесены следующие образцы: М – маркер молекулярной массы белков PageRuler Prestained Protein Ladder (10–180 кДа; Thermo Fisher Scientific, США); образец AAV-DJ-GFP после трехступенчатой очистки ПЭГ–(NH₄)₂SO₄ (1); после осаждения ПЭГ и УЦ в градиенте плотности йодиксанола (2); после УЦ в градиенте плотности йодиксанола (3); после осаждения ПЭГ и АОХ с линейным градиентом 15–500 мМ NH₄ОAc (4); после осаждения ПЭГ и АОХ со ступенчатым градиентом 150–500 мМ NH₄ОAc (5); после очистки осветленного лизата АОХ с линейным градиентом 15–500 мМ NH₄ОAc (6). На каждую дорожку нанесено 1×10^7 TU AAV. Стрелкой указан капсидный белок AAV – VP3 (M_r 62 кДа).

Fig. 2. Electrophoretic analysis of AAV-DJ-GFP samples before concentration and dialysis. The following samples were applied to the 10% SDS-PAGE: M – protein molecular weight marker PageRuler Prestained Protein Ladder (10–180 kDa; Thermo Fisher Scientific, USA); AAV-DJ-GFP sample after three-step purification with PEG–(NH₄)₂SO₄ (1); after PEG precipitation and Iodixanol density gradient ultracentrifugation (2); after Iodixanol density gradient ultracentrifugation (3); after PEG precipitation and AEC using the linear gradient of 15–500 mM NH₄OAc (4); after PEG precipitation and AEC using the step gradient of NH₄OAc (5); after purification of the clarified lysate by AEC using the linear gradient of 15–500 mM NH₄OAc (6). Each track contains 1×10^7 TU AAV. The arrow indicates the AAV capsid protein – VP3 (M_r 62 kDa).

диализа”: 1×10^8 против 1×10^7 TU AAV. Это позволило детектировать не только капсидный белок VP3, но и VP1 и VP2 (рис. 3). В лунки геля наносили образцы в двух вариантах: содержащие одинаковое число инфекционных частиц: 1×10^8 TU/лунка, что соответствовало $(2.3–5.0) \times 10^{10}$ векторных геномов (табл. 5), или одинакового объема.

Как и в образцах до диализа и концентрирования, самое высокое содержание посторонних белков обнаружено в препарате AAV-DJ-GFP после трехступенчатой очистки ПЭГ и сульфатом аммония. В то же время различий между степенью

чистоты препаратов вектора, полученных после АОХ или ПЭГ + АОХ (ступенчатое или линейное элюирование), на данном этапе не выявлено. Более того, образцы AAV-DJ-GFP, очищенные АОХ, в том числе без предварительного осаждения ПЭГ, не отличались по содержанию примесных белков от образцов, очищенных методом УЦ. Таким образом, ультрафильтрация на Amicon Ultra с порами 100 кДа после АОХ позволила эффективно избавиться от примесных белков, которые детектировали на предыдущем этапе очистки. Пока не выяснена причина появления примесного низко-

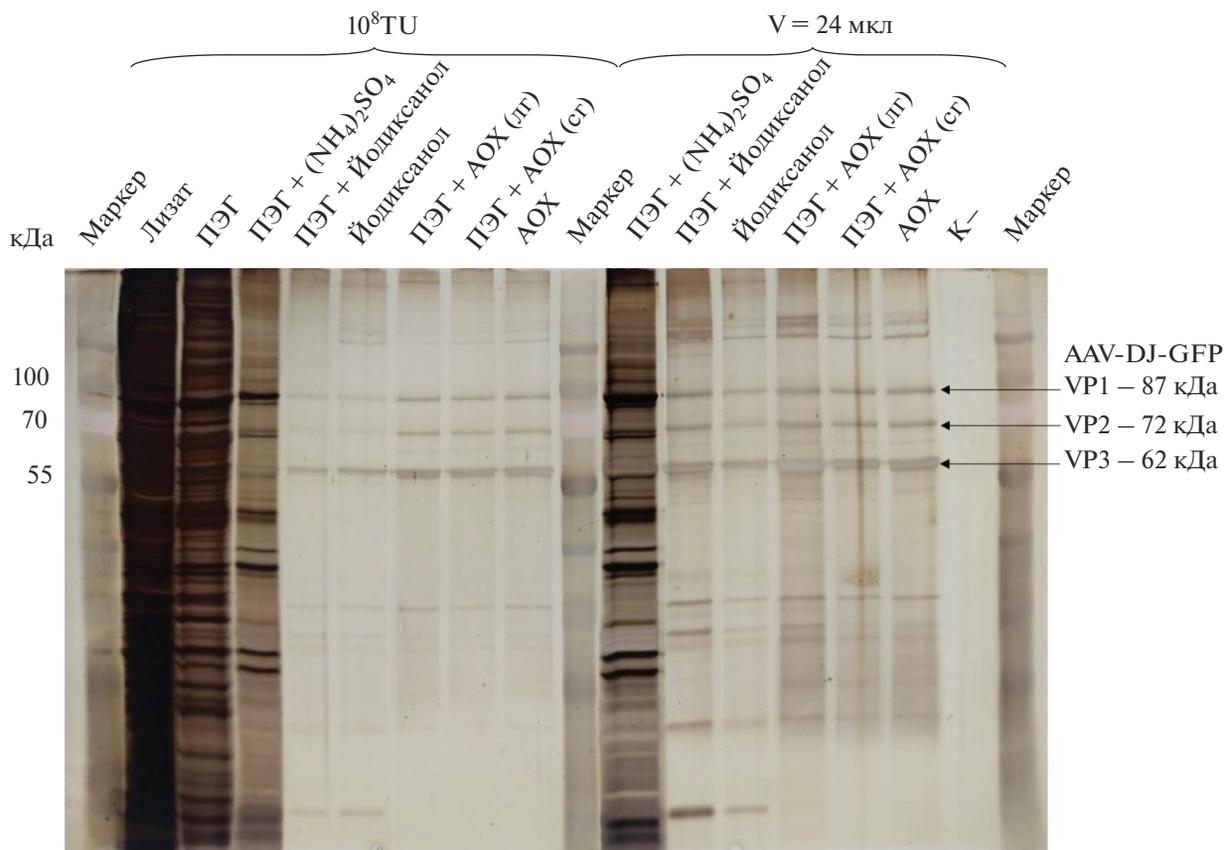


Рис. 3. Электрофоретический анализ образцов AAV-DJ-GFP после концентрирования и диализа. На каждую дорожку наносили либо 1×10^8 TU образца (слева), либо 24 мкл (справа). Маркер – маркер молекулярной массы белков PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); Лизат – осветленный лизат (AAV-DJ-GFP до очистки); ПЭГ – осажденный ПЭГ образец AAV-DJ-GFP; ПЭГ + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – образец AAV-DJ-GFP после трехступенчатой очистки ПЭГ– $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; ПЭГ+Йодиксанол – образец AAV-DJ-GFP после осаждения ПЭГ с последующим УЦ в градиенте плотности йодиксанола; Йодиксанол – образец AAV-DJ-GFP после УЦ в градиенте плотности йодиксанола; ПЭГ + АОХ (лг) – образец AAV-DJ-GFP после осаждения ПЭГ и АОХ с линейным градиентом 15–500 мМ NH_4OAc ; ПЭГ+АОХ (сг) – образец AAV-DJ-GFP после осаждения ПЭГ и АОХ со ступенчатым градиентом 150–500 мМ NH_4OAc ; АОХ – образец AAV-DJ-GFP после очистки АОХ с элюированием линейным градиентом 15–500 мМ NH_4OAc ; К⁻ – отрицательный контроль (буфер для нанесения образцов). VP1, VP2, VP3 – капсидные белки AAV: 87, 72 и 62 кДа соответственно.

Fig. 3. Electrophoretic analysis of AAV-DJ-GFP samples after concentration and dialysis. Each track was loaded with either 1×10^8 TU (left) or 24 μL (right) of sample. Marker, protein molecular weight marker PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); Lysate, clarified lysate AAV-DJ-GFP (before purification); PEG, AAV-DJ-GFP sample after PEG precipitation; PEG+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, AAV-DJ-GFP sample after three-step purification with PEG– $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; PEG+Iodixanol, AAV-DJ-GFP sample after PEG precipitation followed by ultracentrifugation (UC) in a iodixanol density gradient; Iodixanol, AAV-DJ-GFP sample after UC in a iodixanol density gradient; PEG+AEC (lg), AAV-DJ-GFP sample after PEG precipitation and AEC with a linear gradient of 15–500 мМ NH_4OAc ; PEG+AEC (cg), AAV-DJ-GFP sample after PEG precipitation and AEC with a step gradient of 150–500 мМ NH_4OAc ; AEC, AAV-DJ-GFP sample after AEC with a linear gradient of 15–500 мМ NH_4OAc ; K⁻, negative control (loading buffer). VP1, VP2 and VP3 are AAV capsid proteins: 87, 72 and 62 kDa, respectively.

молекулярного белка в образцах, очищенных йодиксанолом и ПЭГ + йодиксанол, после фильтрации (рис. 3). Следует заметить, что и после УЦ, и после АОХ необходимо проводить смену буфера и концентрирование AAV-DJ-GFP для получения конечного продукта. Поэтому использование для этих целей ультрафильтрации, которая позволяет одновременно удалять примеси, массой менее 100 кДа, представляется весьма целесообразным.

Кроме выявления в образцах примесных белков с использованием электрофореза в SDS-ПААГ, мы

оценили содержание пустых капсидов в очищенных образцах вектора по протоколу, описанному ранее J. Sommer и др. [31]. Метод основан на измерении оптической плотности образцов AAV при длинах волн 260 и 280 нм и расчете соотношения полученных значений (A_{260}/A_{280}). В связи с тем, что для каждого конкретного AAV-вектора это соотношение для полных капсидов определяется размером векторного генома и аминокислотным составом белков капсида определенного серотипа, для количественного определения процента пустых

Таблица 5. Соотношение числа векторных геномов и инфекционных частиц в очищенных препаратах AAV-DJ-GFP**Table 5.** Ratio of the number of vector genomes and infectious particles in purified AAV-DJ-GFP samples

Способ очистки	Число геномов AVV/инфекционная частица, vg/TU
ПЭГ + Йодиксанол	410
Йодиксанол	280
ПЭГ + АОХ (линейный градиент NH ₄ OAc)	340
ПЭГ + АОХ (ступенчатый градиент NH ₄ OAc)	230
АОХ (линейный градиент NH ₄ OAc)	500

Таблица 6. Спектрофотометрический анализ очищенных образцов**Table 6.** Spectrophotometric analysis of purified samples

Способ очистки	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Йодиксанол	1.072 ± 0.109
ПЭГ + АОХ (линейный градиент NH ₄ OAc)	1.175 ± 0.098
ПЭГ + АОХ (ступенчатый градиент NH ₄ OAc)	1.033 ± 0.059
АОХ (линейный градиент NH ₄ OAc)	1.095 ± 0.115

капсидов необходимо использовать адекватные референс-образцы для построения калибровочной кривой. Таких референс-образцов в нашем распоряжении не было, поэтому мы провели

сравнительную оценку препаратов. По результатам измерения A₂₆₀ и A₂₈₀ их соотношения не отличались для образцов, очищенных УЦ в градиенте йодиксанола, и образцов, полученных с использованием разных протоколов АОХ, после диализа и концентрирования (табл. 6). На основании полученных данных можно говорить о сходном содержании пустых капсидов в этих образцах, а значит о сопоставимой эффективности их очистки, то есть технология АОХ в этом случае не уступает “золотому стандарту”. Однако заметим, что для более точного количественного определения соотношения пустых и полных капсидов в полученных препаратах необходимо использовать электронную микроскопию.

На электрофореграмме, представленной на рис. 3, можно видеть, что интенсивность полос в образцах, очищенных с помощью йодиксанола, ниже, чем в образцах, очищенных АОХ, несмотря на одинаковое содержание инфекционных частиц (1.0×10^8 TU). Большое количество капсидных белков, приходящихся на каждый инфекционный вектор в образцах после АОХ по сравнению с йодиксанолом, может быть обусловлено либо большей пропорцией пустых капсидов, либо присутствием полных частиц с поврежденными капсидами, не способными доставлять векторную ДНК в клетки (в таких образцах будет наблюдаться увеличение соотношения числа AVV-геномов и трансдукционных единиц, vg/TU). Полученные нами данные о сходном проценте пустых AVV-капсидов в разных образцах (табл. 6) и варьировании соотношения vg/TU случайным образом в диапазоне 230–500 (табл. 5) не позволяют подтвердить ни одну из выдвинутых гипотез. Однако необходимо учитывать, что разрешающая способность методов, используемых для вычисления vg/TU

Таблица 7. Выход инфекционных частиц вектора AAV-DJ-GFP на разных этапах очистки**Table 7.** The yield of infectious particles of the AAV-DJ-GFP vector at different purification stages

Способ очистки	Выход после ПЭГ, %	Выход до фильтрации, %		Выход после фильтрации, %	
		от предыдущей стадии	от исходного	от предыдущей стадии	от исходного
ПЭГ–(NH ₄) ₂ SO ₄	66	97	65	67	43
ПЭГ + йодиксанол	77	18	14	63	9
Йодиксанол		39	39	42	16
ПЭГ + АОХ (линейный градиент NH ₄ OAc)	75	45	33	93	31
ПЭГ + АОХ (ступенчатый градиент NH ₄ OAc)	88	54	47	44	21
АОХ (линейный градиент NH ₄ OAc)		58	58	28	16

Примечание: За 100% принято значение TU для осветленного лизата, содержащего AAV-DJ-GFP.

Note: The TU value for the clarified lysate containing AAV-DJ-GFP was taken as 100%.

(ПЦР-РВ и определение инфекционного титра) и метода определения соотношения пустых и полных капсидов, базирующегося на отношении A_{260}/A_{280} [31], может не выявлять различия в 2–4 раза, которые видны на электрофореграмме. Для выяснения причин указанных различий необходимо проведение дополнительных исследований с применением более точных методов.

Выход целевого продукта

Для анализа эффективности процесса очистки с точки зрения выхода целевого продукта, AAV-DJ-GFP, использовали показания инфекционного титра (табл. 7). Заметим, что оценка выхода по числу инфекционных частиц (а не векторных геномов) позволяет наиболее полно охарактеризовать методику очистки с точки зрения сохранения функциональности вирусных частиц.

Из приведенных в табл. 7 данных видно, что значительное количество AAV-частиц терялось на стадии обработки ПЭГ. Выход инфекционных частиц AAV после этапа АОХ (в разных вариантах) в расчете на предыдущую стадию был сопоставимым (45–58%) и выше, чем при использовании УЦ в градиенте йодиксанола (18 и 39%). Осаждение частиц с помощью ПЭГ перед очисткой в градиенте йодиксанола оказалось неоправданным, так как приводило к потере 86% частиц до диализа и 91% после. Наибольший выход инфекционных AAV-частиц получен при использовании ПЭГ– $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, однако, как показано выше (рис. 3), этот препарат содержит большое количество примесных белков даже после ультрафильтрации.

На этапе диализа на центрифужных концентраторах Amicon Ultra-15 потери сильно варьировали и в некоторых случаях составляли более 50% (табл. 7). Причины такой высокой вариабельности мы не анализировали. В проведенном нами исследовании использование фильтров Amicon Ultra для диализа и концентрирования образцов было связано с малыми рабочими объемами, но применение центрифужных концентраторов на производстве невозможно, поскольку не может быть масштабировано. В связи с этим этап диализа и концентрирования препарата на основе AAV-DJ в дальнейшем будет оптимизирован. Так, для ультрафильтрации наиболее рационально использовать тангенциальную поточную фильтрацию — метод, который легко масштабируется и дает высокий выход продукта. Кроме того, при производстве в лабораторном масштабе в качестве заключительного этапа можно использовать гель-фильтрацию [30], которая позволяет достигнуть тех же целей: сконцентрировать частицы, избавиться от низкомолекулярных примесей, сменить буферный раствор.

Остается под вопросом необходимость использования до хроматографии этапа ПЭГ-осаждения.

Если оптимизировать ультрафильтрацию (используя тангенциальную поточную фильтрацию) таким образом, чтобы она обеспечивала высокий выход векторных частиц и их доочистку, предварительное ПЭГ-осаждение можно не проводить, что приведет к увеличению выхода целевого продукта. Однако для тестирования эффективности протокола с тангенциальной поточной фильтрацией необходимо проводить более масштабные наработки вектора.

Таким образом, в ходе работы подобраны условия очистки частиц AAV-DJ методом анионообменной хроматографии. Степень очистки вирусных частиц оказалась сравнима с препаратами, очищенными по “золотому стандарту” — ультрацентрифугированием в градиенте йодиксанола; при этом анионообменная хроматография обладает важным преимуществом перед ультрацентрифугированием — этот процесс подлежит масштабированию. По выходу целевого продукта предложенный нами протокол даже превосходит “золотой стандарт”. В целом, предложенные нами условия проведения анионообменной хроматографии для очистки клеточного лизата, содержащего аденоассоциированный вирус DJ, могут быть использованы в качестве протокола для производства генотерапевтических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keeler A.M., Flotte T.R. Recombinant adeno-associated virus gene therapy in light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): where are we, and how did we get here? *Annu. Rev. Virol.*, 2019, 6(1), 601–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015530>
2. Mendell J.R., Al-Zaidy S.A., Rodino-Klapac L.R., Goodspeed K., Gray S.J., Kay C.N., Boye S.L., Boye S.E., George L.A., Salazar S., Corti M., Byrne B.J., Tremblay J.P. Current clinical applications of *in vivo* gene therapy with AAVs. *Mol. Ther.*, 2021, 29(2), 464–488. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.12.007>
3. Li C., Samulski R.J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.*, 2020, 21(4), 255–272. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>
4. Grimm D., Lee J.S., Wang L., Desai T., Akache B., Storm T.A., Kay M.A. *In vitro* and *in vivo* gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and re-targeting of adeno-associated viruses. *J. Virol.*, 2008, 82(12), 5887–5911. <https://doi.org/10.1128/JVI.00254-08>
5. Wei J., Ran G., Wang X., Jiang N., Liang J., Lin X., Ling C., Zhao B. Gene manipulation in liver ductal organoids by optimized recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Biol. Chem.*, 2019, 294(38), 14096–14104. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008616>
6. Hickey R.D., Lillegard J.B., Fisher J.E., McKenzie T.J., Hofherr S.E., Finegold M.J., Nyberg S.L., Grompe M. Efficient production of Fah-null heterozygote pigs by

- chimeric adeno-associated virus-mediated gene knockout and somatic cell nuclear transfer. *Hepatology*, 2011, 54(4), 1351–1359.
<https://doi.org/10.1002/hep.24490>
7. Liu J., Moon Y.A. Simple purification of adeno-associated virus-DJ for liver-specific gene expression. *Yonsei Med. J.*, 2016, 57(3), 790–794.
<https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.3.790>
 8. Melo S.P., Lisowski L., Bashkirova E., Zhen H.H., Chu K., Keene D.R., Marinkovich M.P., Kay M.A., Oro A.E. Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant. *Mol. Ther.*, 2014, 22(4), 725–733.
<https://doi.org/10.1038/mt.2013.290>
 9. Danilov K.A., Vassilieva S.G., Polikarpova A.V., Starikova A.V., Shmidt A.A., Galkin I.I., Tsitrina A.A., Egorova T.V., Orlov S.N., Kotelevtsev Y.V. In vitro assay for the efficacy assessment of AAV vectors expressing microdystrophin. *Exp. Cell Res.*, 2020, 392(2), 112033.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112033>
 10. Katada Y., Kobayashi K., Tsubota K., Kurihara T. Evaluation of AAV-DJ vector for retinal gene therapy. *PeerJ*, 2019, 7, e6317.
<https://doi.org/10.7717/peerj.6317>
 11. Lakhan R., Baylink D.J., Lau K.H., Tang X., Sheng M.H., Rundle C.H., Qin X. Local administration of AAV-DJ pseudoserotype expressing COX2 provided early onset of transgene expression and promoted bone fracture healing in mice. *Gene Ther.*, 2015, 22(9), 721–728.
<https://doi.org/10.1038/gt.2015.40>
 12. Xie Q., Spear J.M., Noble A.J., Sousa D.R., Meyer N.L., Davulcu O., Zhang F., Linhardt R.J., Stagg S.M., Chapman M.S. The 2.8 Å electron microscopy structure of adeno-associated virus-DJ bound by a heparinoid pentasaccharide. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2017, 5, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.02.004>
 13. Candelas M., Reynders A., Arango-Lievano M., Neumayer C., Fruquière A., Demes E., Hamid J., Lemmers C., Bernat C., Monteil A., Compan V., Laffray S., Inquimbert P., Le Feuvre Y., Zamponi G.W., Moqrach A., Bourinet E., Méry P.F. Cav3.2 T-type calcium channels shape electrical firing in mouse Lamina II neurons. *Sci. Rep.*, 2019, 9(1), 3112.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39703-3>
 14. Nass S.A., Mattingly M.A., Woodcock D.A., Burnham B.L., Ardinger J.A., Osmond S.E., Frederick A.M., Scaria A., Cheng S.H., O’Riordan C.R. Universal method for the purification of recombinant AAV vectors of differing serotypes. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2017, 9, 33–46.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.12.004>
 15. Wang Q., Lock M., Prongay A.J., Alvira M.R., Petkov B., Wilson J.M. Identification of an adeno-associated virus binding epitope for AVB sepharose affinity resin. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2015, 2, 15040.
<https://doi.org/10.1038/mtm.2015.40>
 16. Zhao H., Lee K.J., Daris M., Lin Y., Wolfe T., Sheng J., Plewa C., Wang S., Meisen W.H. Creation of a high-yield AAV vector production platform in suspension cells using a design-of-experiment approach. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2020, 18, 312–320.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.004>
 17. Рябова Е.И., Деркаев А.А., Есмагамбетов И.Б., Щедляков Д.В., Довгий М.А., Бырихина Д.В., Прокофьев В.В., Чемоданова И.П. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2021, 21(4), 266–278.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>
 18. El Andari J., Grimm D. Production, processing, and characterization of Synthetic AAV gene therapy vectors. *Biotechnol. J.*, 2021, 16(1), e2000025.
<https://doi.org/10.1002/biot.202000025>
 19. Qu G., Bahr-Davidson J., Prado J., Tai A., Cataniag F., McDonnell J., Zhou J., Hauck B., Luna J., Sommer J.M., Smith P., Zhou S., Colosi P., High K.A., Pierce G.F., Wright J.F. Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography. *J. Virol. Methods*, 2007, 140(1–2), 183–192.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.019>
 20. Okada T., Nonaka-Sarukawa M., Uchibori R., Kinoshita K., Hayashita-Kinoh H., Nitahara-Kasahara Y., Takeda S., Ozawa K. Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum. Gene Ther.*, 2009, 20(9), 1013–1021.
<https://doi.org/10.1089/hum.2009.006>
 21. Urabe M., Nakakura T., Xin K.Q., Obara Y., Mizukami H., Kume A., Kotin R.M., Ozawa K. Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J. Virol.*, 2006, 80(4), 1874–1885.
<https://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1874-1885.2006>
 22. Qu W., Wang M., Wu Y., Xu R. Scalable downstream strategies for purification of recombinant adeno-associated virus vectors in light of the properties. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2015, 16(8), 684–695.
<https://doi.org/10.2174/1389201016666150505122228>
 23. Urabe M., Xin K.Q., Obara Y., Nakakura T., Mizukami H., Kume A., Okuda K., Ozawa K. Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol. Ther.*, 2006, 13(4), 823–828.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.11.024>
 24. Kaludov N., Handelman B., Chiorini J.A. Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum. Gene Ther.*, 2002, 13(10), 1235–1243.
<https://doi.org/10.1089/104303402320139014>
 25. Guan J.S., Chen K., Si Y., Kim T., Zhou Z., Kim S., Zhou L., Liu X.M. Process improvement of adeno-associated virus (AAV) production. *Front. Chem. Eng.*, 2022, 4, 830421.
<https://doi.org/10.3389/fceng.2022.830421>
 26. Zolotukhin S., Byrne B.J., Mason E., Zolotukhin I., Potter M., Chesnut K., Summerford C., Samulski R.J., Muzyczka N. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.*, 1999, 6(6), 973–985.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300938>

27. Guo P., El-Gohary Y., Prasad K., Shiota C., Xiao X., Wiersch J., Paredes J., Tulachan S., Gittes G.K. Rapid and simplified purification of recombinant adeno-associated virus. *J. Virol. Methods*, 2012, 183(2), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.04.004>
28. Kimura T., Ferran B., Tsukahara Y., Shang Q., Desai S., Fedoce A., Pimentel D.R., Luptak I., Adachi T., Ido Y., Matsui R., Bachschmid M.M. Production of adeno-associated virus vectors for *in vitro* and *in vivo* applications. *Sci. Rep.*, 2019, 9(1), 13601. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49624-w>
29. Aurnhammer C., Haase M., Muether N., Hausl M., Rauschhuber C., Huber I., Nitschko H., Busch U., Sing A., Ehrhardt A., Baiker A. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum. Gene Ther. Methods*, 2012, 23(1), 18–28. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2011.034>
30. Tomono T., Hirai Y., Okada H., Miyagawa Y., Adachi K., Sakamoto S., Kawano Y., Chono H., Mineno J., Ishii A., Shimada T., Onodera M., Tamaoka A., Okada T. Highly efficient ultracentrifugation-free chromatographic purification of recombinant AAV serotype 9. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2018, 11, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.10.015>
31. Sommer J.M., Smith P.H., Parthasarathy S., Isaacs J., Vijay S., Kieran J., Powell S.K., McClelland A., Wright J.F. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement. *Mol. Ther.*, 2003, 7(1), 122–128. [https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(02\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(02)00019-9)

Purification of Adeno-Associated DJ Virus by Anion-Exchange Chromatography: Optimization of Conditions

D. V. Glazkova^{a, #}, E. A. Mikhaylyuk^a, G. A. Shipulin^a, and E. V. Bogoslovskaya^a

^aFederal State Budgetary Institution “Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks” of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121 Russia

[#]e-mail: georgin2702@gmail.com

Abstract—Adeno-associated virus-based vectors (AAV-vectors) are effective tools for gene delivery. Several AAV-based drugs have already been approved for gene therapy, and the development of AAV vectors for the treatment of various diseases continues. Over time, new promising variants of AAV-vectors with modified capsids appear, one of which is AAV-DJ. To introduce a new vector into clinical practice, it is necessary to develop a technology for its production, including a purification process. Chromatography is the most promising method for scaling vector production. However, chromatography conditions have to be optimized for each AAV capsid. We developed a protocol for purification of AAV-DJ vector by anion-exchange chromatography, and compared obtained target product in terms of quality (purity and infectivity) and yield with AAV-DJ vector purified by the classical method – ultracentrifugation in iodixanol gradient.

Keywords: adeno-associated virus, AAV-DJ vector, anion-exchange chromatography, infectious titer, protein impurities, iodixanol, ultracentrifugation