

## ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА РЕКОМБІНАНТНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ВІРУСУ ПАПІЛОМИ ЛЮДИНИ

**Л.О. ПІВЕНЬ<sup>1\*</sup>, О.М. ОГУРЦОВ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> магістрант кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, НТУ «ХПІ», Харків, УКРАЇНА

<sup>2</sup> завідувач кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, д-р. фіз.-мат. наук, проф., НТУ «ХПІ», Харків, УКРАЇНА

\*email: Lyudmila.x.95@gmail.com

Проблемою профілактики і своєчасної діагностики раку шийки матки залишається актуальною в сучасній гінекології, оскільки від цієї хвороби в Україні кожного року помирає близько 2500 жінок, 500 із них працездатного віку. Останнє десятиріччя характеризується зміною структури захворювань на рак шийки матки, у всьому світі визначена тенденція до збільшення кількості випадків раку шийки матки серед жінок репродуктивного віку. Такий стан проблеми показує, що рак шийки матки на сьогодні – друга по частоті онкологічна причина смерті молодих жінок і вступає лише раку молочної залози. Саме тому в боротьбі з поширенням такого тяжкого захворювання перевага надається профілактиці папіломавірусної інфекції, вчасності шляхом індукування імунної відповіді у людини при вакцинації.

На даний час на міжнародному ринку широко використовуються 2 вакцини проти вірусу папіломи людини (ВПЛ). Обидві виготовлені з очищених структурних білків L1, які самостійно формують типоспецифічні для ВПЛ порожні раковини або вірусоподібні частки (VLPs). Жодна з вакцин не містить живих біологічних продуктів або вірусних ДНК і, отже, не є інфекційною. Вакцини проти ВПЛ призначені тільки для профілактичних цілей, вони не усувають існуючу інфекцію і не мають лікувальний ефект при захворюваннях, викликаних вірусом папіломи людини.

Вакцина проти вірусу папіломи людини виробляють методом рекомбінантних ДНК. Створена на основі VLP головного капсидного білка L1 HPV типів 16 та 18 отриманих шляхом культивування рекомбінантних клітин дріжджів *Hansenula Polymorpha*. На жаль, в ході отримання і культивування штама виникали мутації, які змінювали властивості цільового білка. При цьому контроль за виникненням мутацій в випадку високої копійності гену практично неможливий. Більше того, при підвищенні певного рівня синтезу може порушуватися процес укладки цільового білка, що приводить до пониження його виходу, погіршенню біологічної активності та ускладнюється процес очистки. Тому постає проблема в пошуку штама-продуцента, який буде забезпечувати високий вихід продукції, не впливаючи на властивості цільового білка. Таким штамом-продуцентом являється *Pichia Pastoris*. Штам забезпечує високу мітотичну стабільність клітин, дає можливість оптимізувати умови

культивування без урахування ризику накоплення клітин, які втратили здатність синтезувати чужорідний білок [1]. При отриманні антигену, здійснювали два пасажі рекомбінантних клітин *P. Pastoris*. Ферментацію рекомбінантних клітин дріжджів *P. Pastoris* здійснювали в два етапи. На першому етапі в режимі ФЕД-Бетча при температурі 30 °С нарощували біомасу в культуральному середовищі, що містить 4% дріжджового екстракту, 2 % бакто-пептону і 4 % гліцерину. Коли щільність сирової біомаси досягала 150 г/л (приблизно через 28–32 години ферментації), додавали індуктор до концентрації 0,5-0,8 % і підтримували на цьому рівні протягом 48–72 годин. Після ферментації рекомбінантних клітин виділяємо білок HPV16-L1. Клітини з культуральної рідини облягали центрифугуванням при 4000 g протягом 15 хвилин при 4 °С. Далі клітини руйнували в млині Дупо-МШ типу KDL, використовуючи скляні кулі діаметром 0,5-0,7 мм. Для видалення основної маси нецільових білків і виділення антигену отриманий екстракт насичували сульфатом амонію до 45 % від насичення і обложени білки відокремлювали центрифугуванням при 12000g протягом 30 хвилин. Осад розводили в мінімальному обсязі буфера PBS (pH 7.2) + 0.01% Tween-80 і діалізували в цей же буфер протягом 24 годин при кімнатній температурі для осадження частини залишилися домішкових білків, які потім відокремлювали центрифугуванням при 12000g протягом 30 хвилин. Отриманий супернатант діалізували в буфер для зв'язування: PBS (pH 7.0), що містить 0.33M NaCl і 0.01 % Tween-80 з подальшою адсорбцією на сорбент Непарін Sepharose CL-6B [2]. Після промивання сорбенту тим же буфером для зв'язування білок HPV16-L1 елюювали лінійним градієнтом від 0,33 до 1,5 M NaCl. Об'єднані фракції, що містять антиген, концентрували ультрафільтрацією в тангенціальному потоці на мембрані 500 KDa і розділяли за допомогою зонального ультрацентрифугування в градієнті гліцерин/сахароза. Фракції, що містять цільовий білок, об'єднували, а потім очищали гельфільтрацією на сорбенті Toyopearl HW-65. Чистоту отриманого таким чином рекомбінантного білка HPV-L1 визначали методом SDS-PAGE електрофорезу. Якщо чистота білка була недостатня (менше 95 %), виробляли додаткове очищення за допомогою катіонообмінної хроматографії на сорбенті Toyopearl SP-650M. Вихід цільового білка становив не менше 75 мг з 1 л культуральної рідини.

Використання штам-продуцента *P. Pastoris*, приводить до підвищення якості продукту за рахунок зниження мутацій, а також збільшується вихід продукції, що зменшує термін окупності вакцини.

#### Список літератури:

1. Пат. 2546243 Російської Федерації, МПК C12N1 / 15, C12N15 / 37, C07K14 / 025. Рекомбінантна вакцина для профілактики папіломовірусної інфекції людини та спосіб її отримання / М.А. Кримський; заявник і власник патенту закр. Акц. Суспільство науково-виробнича компанія "Комбіотех". – №2011105289 / 10; заявл. 15.02.2011; опубл.: 20.03.2012.
2. Півень, Л.О. Біотехнологічне виробництво рекомбінантної вакцини проти вірусу папіломи людини: дипл. проект, керівник проф. Краснопольський Ю.М. / Л.О. Півень. – Харків. – 2017. – 67 с.