

УДК 573.6.086.83

РАЗРАБОТКА МАСШТАБИРУЕМОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ СУПЕРСКРУЧЕННОЙ ФОРМЫ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Бойцова Д.В. (Университет ИТМО)

Научный руководитель – заведующий лабораторией разработки биопроцессов

Ищук С.А. (ЗАО «Фарм-Холдинг»)

Введение. В последние годы растет спрос на эффективные и масштабируемые методы производства плазмидной ДНК (пДНК). Такой всплеск возник в ответ на прогресс в использовании пДНК в вакцинах и генной терапии и является перспективным направлением в биотехнологии [1]. Несмотря на богатый опыт использования плазмид в качестве векторов в молекулярной биологии, важным условием применения плазмид в терапевтических целях является крупномасштабность производства. Такой переход требует оптимизации всех этапов, но главным образом стадий выделения и очистки. Сейчас не существует единой платформы производственного масштаба получения пДНК, поэтому разработка масштабируемой технологии получения пДНК- одна из актуальных задач современной биотехнологии.

Основная часть. В задачи работы входила разработка и оптимизация этапов downstream: разрушение клеточной биомассы, концентрирование целевого продукта и последующая хроматографическая очистка. Разрушение клеточной биомассы проводили методом щелочного лизиса с добавлением SDS с последующей нейтрализацией сульфатом аммония. В стадию нейтрализации проводилось осаждение белковых примесей и клеточного дебриса доведением содержания сульфата аммония до 2,5 М и центрифугированием. Данный этап позволяет облегчить стадию фильтрации за счет снижения нагрузки на фильтр [2]. При проведении классического щелочного лизиса после удаления примесей следует осаждение пДНК изопропиловым спиртом для концентрирования образца [1], но при масштабировании этот этап заменен на более производительную тангенциальную фильтрацию. Хроматография является эффективным, универсальным и автоматизируемым способом очистки, поэтому разделение пДНК от РНК, белков и других примесей производили при помощи эксклюзионной хроматографии на сорбенте Seplife 6 Fast Flow [3]. Далее для нанесения на анионообменную хроматографию необходимо сменить буфер и снизить проводимость раствора образца. Для этого использовали диафильтрацию на VIVAFLow 200. Затем получение целевой формы суперскрученной формы пДНК и финишную очистку от эндотоксинов осуществляли путем анионообменной хроматографии на сорбенте carto Q Impres [3].

Преимуществами данной технологии являются: использование доступных реактивов, отсутствие рибонуклеаз и протеиназ, что упрощает и сокращает очистку. Сложные для масштабирования методы спиртового осаждения ДНК заменены на более высокопроизводительные и автоматизируемые методы тангенциальной фильтрации и хроматографической очистки.

Выводы. Была разработана технология получения суперскрученной формы плазмидной ДНК и проведена ее апробация в пилотном масштабе с получением целевой формы пДНК без примесей нуклеиновых кислот, эндотоксинов и белков в граммовых количествах. Полученный образец соответствовал целевым характеристикам качества: подлинность объекта подтверждалась секвенированием и рестрикционным анализом; чистота оценивалась агарозным электрофорезом и АЕХ-ВЭЖХ.

Список использованных источников:

1. Voss C. Production of plasmid DNA for pharmaceutical use // *Biotechnology Annual Review*. – 2007. – Volume 13. – Pages 201-222.
2. Figueroa-Bossi N, Balbontín R, Bossi L. Preparing Plasmid DNA from Bacteria // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2022. – Т. 2022. – №. 10. – С. pdb. prot107852.
3. Stadler J, Lemmens R, Nyhammar T. Plasmid DNA purification // *The Journal of Gene Medicine*. – 2004. – Volume 6. – Pages S54-66.

Бойцова Д.В. (автор)

Подпись

Ищук С.А. (научный руководитель)

Подпись