

УДК 615.3

**Оптимизация транзientной трехплазмидной трансфекции с помощью DoE для повышения титра при наработке рекомбинантных вирусных векторов**

**Грибков Э.** (Университет ИТМО, АО «БИОКАД»)

**Научный руководитель – кандидат биологических наук, ординарный доцент**

**Перепелкина М. П.** (АО «БИОКАД», Университет ИТМО),

**кандидат биологических наук, ординарный доцент Гершович П.М.** (АО «БИОКАД», Университет ИТМО)

**Введение.** Генная терапия является одной из перспективнейших направлений в биофармацевтике. По исследованиям организации Precedence Research [1], в 2023 году мировой рынок генотерапии оценивается в 7,74 млрд. долларов США, и достигнет более 38,76 млрд. долларов США к 2032 году, со среднегодовым темпом роста 19,6% с 2023 по 2032 год. При этом Precedence Research отмечает, что порядка 85% от общей доли выручки приходится именно на векторные препараты, и ожидается, что сегмент вирусных векторов в генной терапии будет расти в течение всего отмеченного периода [1]. Соответственно, для биофармацевтических компаний, занимающихся разработкой и производством генотерапевтических препаратов, как никогда актуально использование вирусных векторов, в частности на базе аденоассоциированных вирусов (AAV). Одним из важнейших этапов производства препарата является наработка рекомбинантных вирусных векторов (rAAV). Наиболее часто для наработки rAAV используется метод трехплазмидной транзientной трансфекции. Первая плазида содержит ген интереса (GOI), вторая - гены капсида и гены, необходимые для сборки вируса (Rep и Cap), а третья - гены вируса-помощника (Helper) [2, 3]. В зависимости от серотипа вируса и гена-интереса варьирует и выход (титр) наработанного rAAV. Увеличить титр можно за счет подбора условий культивирования, модификации используемых генетических конструкций, а также оптимального подбора соотношения плазмид и вариации концентрации плазмидной ДНК при наработке rAAV.

**Основная часть.** В рамках продуктового проекта по разработке генотерапевтического препарата в компании АО «БИОКАД», была поставлена задача по увеличению титра целевых rAAV с использованием заданных плазмид. Было принято решение оптимизировать процесс транзientной трехплазмидной трансфекции с помощью статистического подхода к постановке экспериментов Designe of Experiment (DoE). Данный подход учитывает влияние каждого фактора и их влияние друг на друга, позволяет спрогнозировать оптимальное соотношение факторов для достижения наилучшего отклика.

Для того, чтобы собрать входные данные для DoE, мы провели серию экспериментов с рандомизированным соотношением и нагрузкой плазмидной ДНК. Нагрузка ДНК при трансфекции варьировалась от 0,57 до 2,8 мкг/мл культуральной жидкости (КЖ), а соотношение плазмид друг к другу от 1:1 до 5:5.

Полученные данные были использованы для дизайна эксперимента с помощью программы MiniTab 21.4.2 (64-bit). Был сгенерирован троичный график, на котором отображены 13 точек с различным соотношением трех плазмид, которые были использованы для постановки эксперимента. На основании полученных экспериментальных данных была построена модель зависимости титров rAAV от соотношения плазмид, которая описывала полученные данные с вероятностью 90%. Предсказанный моделью оптимум был проверен экспериментально и подтвердил гипотезу.

**Выводы.** При помощи DoE было найдено оптимальное соотношение заданных плазмид для повышения титра при наработке рекомбинантных вирусных векторов.

Примененный подход DoE с использованием сгенерированного троичного графика является универсальным для поиска оптимального соотношения плазмид при наработке rAAV методом трехплазмидной транзientной трансфекции.

#### **Список использованных источников:**

1. Precedence Research Pvt. Ltd: официальный сайт. – Онтарио, 2023. – URL: <https://www.precedenceresearch.com/gene-therapy-market> (дата обращения: 29.01.2024).
2. R. Jude Samulski, Nicholas Muzyczka. (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu. Rev. Virol.* 1, 427-451.
3. Tsukasa Ohmori. (2020). Advances in gene therapy for hemophilia: basis, current status, and future perspectives. *Int J Hematol.* 111, 31-41.