

**Количественное определение геномов аденоассоциированных вирусов в геннотерапевтических препаратах с помощью цифровой капельной ПЦР**

**Научный руководитель – Малоголовкин Александр Сергеевич**

**Коровина Кристина Алексеевна**

*Студент (магистр)*

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,  
Москва, Россия

*E-mail: korovina\_ka@mail.ru*

Количество геномных копий в вирусном препарате для генной терапии в настоящий момент подсчитывают с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР), имеющей недостатки, связанные с эффективностью ПЦР и построением калибровочной кривой. Метод абсолютного подсчета копий ДНК в образце, цифровая капельная ПЦР (цкПЦР), отличается разбиением реакционной смеси на тысячи капель, в каждой из которых происходит отдельная реакция ПЦР [1].

Целью данной работы является провести сравнительную количественную оценку методов детекции количества геномных копий аденоассоциированных вирусов (ААВ) в препаратах.

Была проведена оценка концентрации экспрессионных плазмид, используемых для получения вектора ААВ, содержащих ген кодирующий зеленый флуоресцентный белок (eGFP). Результаты анализа концентрации в образцах на флуориметре отличаются по количеству копий плазмидной ДНК, полученных при измерении методом цкПЦР не более чем в 5 раз ( $9,92 \cdot 10^5$  и  $2,03 \cdot 10^5$  коп/5мкл, соответственно).

С помощью кПЦР и цкПЦР была проведена количественная оценка препаратов с ААВ, используя праймеры на инвертированные терминальные повторы (ITR), содержащиеся в экспрессионной кассете. Показано, что результаты оценки методом цкПЦР более воспроизводимы, чем методом кПЦР (коэффициент вариации для серии из четырех постановок 5% и 44%). Количество геномных копий, определенных с помощью кПЦР в среднем было больше в 113 раз, чем с помощью цкПЦР ( $1,91 \cdot 10^5$  и  $1,69 \cdot 10^5$  коп/5мкл), что соотносится с данными литературы [2].

Для подтверждения целостности генома и верификации упаковки экспрессионной кассеты проведено нанопоровое секвенирование с использованием MinION и протокола Native Barcoding Sequencing Kit 24 V14. Полученные прочтения оценены наложением на референсную последовательность плазмиды и с глубиной покрытия сборки 1151 показано, что ААВ содержат целевой ген и участки для отжига праймеров на ITR.

Мы показали, что результаты количества копий плазмидной ДНК с помощью цкПЦР отличаются от результатов, полученным на флуориметре, не более чем в 5 раз. Наши данные указывают на завышение результатов оценки количества вирусной ДНК методом кПЦР на два порядка и большую воспроизводимость результатов методом цкПЦР с коэффициентом вариации около 5%. Этот метод может оказаться более точным для анализа концентрации ААВ в геннотерапевтическом препарате что является критически важным при выборе его дозы. Мы предлагаем использовать цкПЦР для точной оценки геномов ААВ в образцах, используемых в качестве эталонных в кПЦР.

**Источники и литература**

- 1) Blay E., Hardyman E., Morovic W. PCR-based analytics of gene therapies using adeno-associated virus vectors: Considerations for cGMP method development //Molecular Therapy Methods & Clinical Development. – 2023. – Т. 31.

- 2) Furuta-Hanawa B., Yamaguchi T., Uchida E. Two-dimensional droplet digital PCR as a tool for titration and integrity evaluation of recombinant adeno-associated viral vectors // Human Gene Therapy Methods. – 2019. – Т. 30. – №. 4. – С. 127-136.