

АВТОНОМНО РЕПЛИЦИРУЮЩИЕСЯ РНК – НОВЫЙ КЛАСС ГЕННОИНЖЕНЕРНЫХ ВЕКТОРОВ

Г.М. Зауатбаева

Национальный центр биотехнологии

Республика Казахстан, 000010, г. Астана, Кургальжинское шоссе 13/5

e-mail: gzauatbaeva@gmail.com

Генетические системы, производящие мРНК и рекомбинантные белки, составляют основную часть объектов интереса для генных инженеров. Большинство генно-инженерных конструкций в рамках исследовательских проектов применяются как инструменты с той целью, чтобы получить транзientную (временную) экспрессию в клетках рекомбинантных белков, или молекул РНК, или более сложных продуктов. Транзientная экспрессия (TGE) имеет значение как метод для промышленного производства биотехнологических продуктов. Соответственно, для исследований и производства важна эффективность экспрессии и оптимизация экспрессионных векторов. Автономно реплицирующиеся РНК – сравнительно новый для отрасли класс векторов, пригодный для использования *in vitro* и *in vivo*, включая продукцию белков или малых РНК, иммунизацию, изучение внутриклеточной регуляции или структуры и функции. Автономно реплицирующиеся РНК, далее называемые РНК-векторы, - высокопроизводительная альтернатива традиционным плазмидным векторам для TGE. Описанные РНК-векторы представляют собой молекулы РНК, реплицирующиеся в цитоплазме с ростом копийности, потому что они кодируют собственную репликазу (комплекс белков, включающий РНК-зависимую РНК-полимеразу). Для таких РНК-векторов цитоплазматическая репликация не требует участия клеточного ядра. РНК-векторы могут быть созданы из геномов РНК-содержащих вирусов и представляют собой репликоны (фрагменты генома, не имеющие генов структурных белков) или дефектные интерферирующие (DI) частицы (модифицированные геномы, которые неспособны к самоподдерживающейся инфекции, если нет хелперной помощи со стороны родительского вируса).

Авторы сконструировали репликоны и DI частицы путём генетической модификации и удаления генов структурных белков из генома вируса венесуэльского энцефалита. Поскольку репликоны и DI частицы неспособны к самостоятельной инфекционной передаче, эти векторы не являются инфекционным материалом, и работа с ними не нарушает регулирования работ с микроорганизмами. Созданные РНК-векторы использованы для создания модельных систем для продукции измеримых маркёров экспрессии: внутриклеточного зелёного флуоресцентного белка (GFP) и секреторного белка - щелочной фосфатазы SEAP. Достигнутые уровни продукции SEAP превышают 40 мкг/10⁷ клеток продуцирующей культуры (4 µg/cell/day), что соответствует верхней границе продуктивности для SEAP, опубликованной в статьях. Системы экспрессии с применением РНК-векторов легко масштабируемы в отношении объёмов продуцирующей культуры и не требуют масштабной трансфекции ДНК (плазмид), что является важным преимуществом в условиях TGE, потому что методы трансфекции плохо масштабируемы. В отличие от плазмид, РНК-векторы могут быть упакованы в репликонные частицы, морфологически подобные вирионам, но безопасные в производстве и использовании. Высокая эффективность получения РНК-вектора, упакованного в репликонные частицы (выход до 10¹⁰ репликонных частиц с 10-см чашки), позволяет получать продуцирующие культуры большого объёма в лабораторных условиях. Авторы продемонстрировали производство секреторируемого рекомбинантного белка в высокоплотных культурах (100,000-150,000 клеток/см²), выращиваемых в 5-ти полочных клеточных станциях, без использования препаративной трансфекции.