

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-24

Обзор

Принципы использования рекомбинантных аденоассоциированных вирусов в исследованиях и терапии

С.А. Марченко ^{1, 2}, Д.А. Ланшаков ^{1, 2, 3} 

Аннотация: Аденоассоциированные вирусы (AAV) прочно вошли в практику научных исследований в широком спектре областей, от молекулярной биологии до физиологии. Они прошли путь от открытия их как вирусов в 1965 г. до широко используемого молекулярно-биологического инструмента на сегодняшний день. Исследователей привлекает в них надежность, стабильная экспрессия трансгена и низкая иммуногенность. Часто AAV становятся привлекательным средством доставки для генотерапии. Все больше фармацевтических компаний запускают клинические испытания с использованием AAV в качестве доставки генотерапии. В 2023 г. Food and Drug Administration (FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, США) был одобрен препарат Roctavian для лечения гемофилии А на основе AAV. Прогресс в этой области навел нас на мысль о его концептуальном обобщении и написании настоящей работы. В статье приведен анализ последних молекулярно-биологических и биотехнологических решений для аденоассоциированной вирусной доставки, а также ее оптимизации на животных моделях и способах сделать ее более направленной. Рассмотрены особенности серотипов аденоассоциированных вирусов, особое внимание уделено их тропизмам к клеткам организма и генно-инженерным способам их изменения – направленной эволюции капсидов, использованию химерных капсидов, сшитых с рецепторами или одноцепочечными антителами альпак. Существенным недостатком AAV является ограниченность кассеты – лишь 4.7 кб генного материала. В обзоре описаны приемы увеличения переносимого генетического материала и осуществления трансдукции длинных по протяженности до 10 кб последовательностей кДНК; собрана информация по проводимым клиническим испытаниям, в которых задействованы AAV, а также охарактеризованы проблемы реализации доставки генов при применении AAV в терапии.

Ключевые слова: аденоассоциированные вирусы (AAV); вирусная доставка; генная терапия; модификация капсида; клинические исследования.

Для цитирования: Марченко С.А., Ланшаков Д.А. Принципы использования рекомбинантных аденоассоциированных вирусов в исследованиях и терапии. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(4):204-215. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-24

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-00154).

Review

Principles for using recombinant adeno-associated viruses in research and therapy

S.A. Marchenko ^{1, 2}, D.A. Lanshakov ^{1, 2, 3} 

Abstract: Adeno-associated viruses (AAVs) have become an integral part of scientific research in fields ranging from molecular biology to physiology. AAV has had a remarkable evolution from being a virus in 1965 to being a stable molecular biology tool today. Researchers are attracted to their reliability, stable transgene expression and low immunogenicity. In many cases, AAV can be an attractive delivery vehicle for gene therapy. Clinical trials using AAV as a gene therapy delivery system are being initiated by an increasing number of pharmaceutical companies. FDA approves Roctavian for AAV-based treatment of hemophilia A in 2023. This progress in the field has led us to think about its conceptual generalization and the writing of this literature review. This article reviews the latest molecular biological and biotechnological solutions for adeno-associated virus delivery, its optimization in animal models, and ways to make it more targeted. The characteristics of the serotypes of adeno-associated viruses are described, with special attention to their tropisms

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetic of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

 lanshakov@bionet.nsc.ru

 © Марченко С.А., Ланшаков Д.А., 2024

to the cells of the body, and genetic engineering methods to modify them: directed evolution of capsids, use of chimeric capsids cross-linked with receptors or single-chain antibodies of alpacas. A major disadvantage of AAV is the limited size of the cassette – only 4.7 kb of genetic material. The review also describes techniques for increasing the amount of genetic material transferred and for performing transduction of cDNA sequences up to 10 kb in length. The review gathers information on ongoing clinical trials using AAV and also describes the challenges of implementing gene delivery when using AAV in therapy.

Key words: adeno-associated viruses (AAV); viral delivery; gene therapy; capsid modification; clinical studies.

For citation: Marchenko S.A., Lanshakov D.A. Principles for using recombinant adeno-associated viruses in research and therapy. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(4):204-215. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-24 (in Russian)

Funding: The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 24-25-00154).

Введение

На сегодняшний день генная терапия – привлекательный подход для возможности лечения многих заболеваний человека, в том числе гемофилии, болезни Паркинсона, наследственного недостатка липопротеинлипазы, миопатии Дюшена и других. Генетический материал возможно доставить в клетки при помощи электропорации, липофекции, мРНК, нуклеопротеиновых частиц, а также ленти- и аденоассоциированных вирусов. В этом обзоре мы осветили последние достижения в использовании рекомбинантных аденоассоциированных вирусов как в генетических исследованиях, так и в терапии заболеваний человека генетической природы.

Характеристики AAV и их открытие

Аденоассоциированные вирусы (AAV) – это малые безоболочечные вирусы, обладающие (+/-)-одноцепочечной ДНК (Zhou et al., 2008) в качестве генома, что является основанием для их классификации как *Dependoparvovirus* из семейства Parvoviridae. Аденоассоциированные вирусы дикого типа (дтААВ) содержат геном приблизительно 4.7 кб длиной, включающий гены *rep* (replication) и *cap* (capsid), фланкированные двумя инвертированными tandemными концевыми повторами. При этом рекомбинантные вирусы могут иметь заданную комплементарность цепи. Так, вирусы, обладающие положительно-смысловой цепью, могут участвовать в синтезе продуктов вирусной ДНК без синтеза комплементарной копии. Однако предпочтительнее использовать двуцепочечную ДНК (каждая цепь упаковывается в капсиде отдельно), поскольку она способна накапливаться в клетках в виде конкатемеров, что позволяет обеспечить экспрессию продуктов генома в дочерних клетках (Wang D. et al., 2019). Конкатемеры – последовательности ДНК, содержащие множественные повторяющиеся копии генома и белки, необходимые для поддержания их структуры.

Открытая рамка считывания *rep* кодирует ферменты, регулирующие процесс репликации, транскрипции, инкапсидации; рамка с альтернативными старт-кодонами гена *cap* кодирует белки капсида вируса: virion protein (VP1, VP2, VP3, содержание которых в капсиде составляет 1:1:10 соответственно (Johnson et al., 1971). Инвертированные tandemные повторы образуют Т-образную шпильку, обеспечивающую «правильную» пространственную структуру для репликации и упаковки генома (Issa et al., 2023). Следовательно, искусственно созданные генетические конструкции на основе векторов AAV способны нести рекомбинантный геном, соот-

ветствующий размеру генома данного вируса, и могут быть изменены с использованием различных вариантов гена *cap* для создания вирионов с необходимыми тропизмами по отношению к тканям. Рекомбинантные AAV, как и дтААВ, вызывают слабую иммунную реакцию и не патогенны. Все эти особенности AAV делают данный метод доставки векторов *in vivo* предпочтительным для генной терапии, направленной на увеличение активности того или иного гена.

Впервые AAV были выделены в 1965 г. в качестве контаминантов препаратов аденовирусов (Issa et al., 2023). Несмотря на данный факт, AAV не связаны с аденовирусами по принципу помощника или сателлита и содержатся в клетках многих организмов, представляя собой латентные инфекционные агенты, способные развивать острую фазу заболеваний при определенных условиях. О доставке гена на основе AAV впервые было сообщено в 1993 г. T.R. Flotte с коллегами добились стабильно протекающей экспрессии белка CFTR (fibrosis membrane conductance regulator) в легочной ткани кролика продолжительностью более 6 месяцев (Flotte et al., 1993).

Данная группа вирусов может распознаваться рецепторами клеток и проникать в везикулах в цитоплазматическое пространство, транспортироваться через ядерные поры и, далее, обеспечивать встраивание вируса в геном путем гомологичной рекомбинации (большинство случаев); негомологичного спаривания концов (NHEJ, non-homologous end joining) в места двуцепочечных разрывов ДНК, находящиеся, как правило, в локусах сателлитных повторов, рДНК, ГЦ-обогащенных участков; сайт-специфичной интеграции в локус генома человека 19q13.2-13.4qtr (*rep*-регион) (Bijlani et al., 2022). В последнем случае вирус встраивает ДНК в AAVS1 (AAV integration site 1) локус, который обладает сайтом концевого разрешения (terminal resolution site). На данном сайте вирусные белки Rep68/78 образуют одноцепочечный разрыв, который позволяет встраиваться вирусной одноцепочечной ДНК (Bijlani et al., 2022). Сайт Rep инициирует активацию синтеза ДНК на локусе AAVS1 и формирует интеграционный комплекс между AAV ДНК и AAVS1 (Hamilton et al., 2004).

дтААВ, находясь в кариоплазме, формируют конкатемеры, не требуют вируса-помощника (за исключением серотипа 5), однако использование многих векторов предполагает наличие вспомогательных последовательностей для успешного клонирования. В каждом конкретном случае выбор одного из методов вставки генома вируса в геном клетки хозяина зависит от ряда факторов, таких как наличие зна-

чимого числа двуцепочечных разрывов, последовательностей, комплементарных ДНК вируса, специфичных сайтов узнавания и прочих. Однако ААВ способны не только трансдуцировать геном в составе хромосом клетки-хозяина, но и реплицировать его в виде конкатемеров в кариоплазме. Так, например, для гепатоцитов характерна именно внехромосомная экспрессия векторной ДНК (свыше 90 % копий) (Nakai et al., 2001).

ААВ-доставка имеет значительный ряд достоинств, что делает ее одной из часто используемых наряду с другими способами доставки. К достоинствам относятся стабильная репликация внутри генома клетки и стабильность сохранения самой вирусной частицы (Greig et al., 2024). Частицы ААВ характеризуются широким тропизмом к тканям, клеткам и клеточным линиям, что делает возможными исследования доставки генов в самые разные линии клеток, в том числе в рамках одной линии рекомбинантных ААВ (Bijlani et al., 2022). В отличие, например, от онкоретровирусов (Segura et al., 2006), инфицирующих только делящиеся клетки, ААВ инфицируют как делящиеся, так и неделящиеся клетки (Pham et al., 2024). В большинстве случаев ААВ обладают относительно малой иммуногенностью при условии правильной оптимизации, как будет показано ниже.

Несмотря на наличие многих преимуществ, ААВ-доставка не лишена и недостатков, основными из которых являются: генерация нереплицирующихся ДНК-векторов в потенциальных клетках (при внехромосомном варианте трансдукции в потенциальную клетку (Nakai et al., 2001)), что приводит к размножению их дефектных копий со снижением терапевтического эффекта (He et al., 2021); ограничения по длине встраиваемого вектора (до 4.7 кб для дтААВ2 или до 5.2 кб для ряда искусственных векторных конструкций (Bennett et al., 2017); иммунологические реакции на данный вирус, что связано с наличием специфичных антител, внутриклеточных механизмов реакции на чужеродную ДНК, системы комплемента и механизмов иммунной памяти (Wang J.-H. et al., 2024).

Серотипы ААВ и их особенности

Вирусы обычно подразделяют по антигенной структуре, определяемой иммунологическими методами, называемой серотипом. На сегодняшний день идентифицировано 13 серотипов дтААВ. От серотипа и, следовательно, от специфичности вируса к распознаванию клеточными рецепторами зависит его тропизм по отношению к разным органам и тканям. Есть и множество других характеристик, отличающих серотипы ААВ: посттрансляционные модификации при сборке вируса в клетке, диапазоны хозяев, размеры капсидов, особенности функционирования генома при сборке вирусов и другие. Тропизм к ЦНС проявляют ААВ серотипов 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10 и 11 (табл. 1).

Последовательности вирусных векторов для осуществления экспрессии и ее специфичности

Вектор ААВ должен содержать: последовательности инвертированных tandemных повторов, одноцепочечный вирусный геном, гомологичные плечи, комплементарные целевым геномным последовательностям. Димерные и са-

мокоплементарные геномы ААВ не способны к успешному введению функционального вектора в клетку, поскольку не образуют петлю гомологичной рекомбинации. Для осуществления экспрессии в вирусных ленти- и ААВ-векторах должны присутствовать специальные последовательности (промоторы) для запуска транскрипции, сайты полиаденилирования для обеспечения стабильности матричной РНК, последовательности Козак для инициации трансляции. Также могут присутствовать посттранскрипционные регуляторные элементы. Обычно используются цис-регуляторные элементы вируса гепатита В (Hepatitis B Virus PRE, 533 п. н.) и вируса гепатита сурка (Woodchuck Hepatitis Virus PRE, 600 п. н.), которые необходимы для экспорта без интронной вирусной РНК из ядра (Powell et al., 2015). Существуют и альтернативные точки зрения на механизмы действия WPRE, например, что этот вирус в большей степени терминирует сквозную транскрипцию при производстве лентивирусов, повышает титр и экспрессию (Higashimoto et al., 2007).

Присутствие данных последовательностей в РНК увеличивает экспрессию трансгена примерно в 6 и 8 раз соответственно в большинстве случаев, но эффект может зависеть от типа клеток и быть совсем незначительным. Часто сразу после промотора ставят интронную последовательность, которая увеличивает процессинг мРНК и экспрессию трансгена примерно в 1.6 раза (Powell et al., 2015). Однако некоторые авторы отмечают отсутствие доказательств воздействия регуляторных элементов на процесс экспорта мРНК из ядра (Hollensen et al., 2017). Они считают, что связывание TuD (RNA polymerase II-transcribed tough decoy, ингибиторы микроРНК) с микроРНК активизирует механизмы тримминга (trimming) или добавления 3'-конца (tailing), обеспечивающие деградацию малых РНК-транскриптов, не оказывая влияния на экспорт из ядра малых РНК. Кроме того, T. Higashimoto с коллегами (2007) отметили шестикратное увеличение скорости экспрессии гена β-галактозидазы при только двукратном повышении содержания продукта в цитоплазме в присутствии WPRE.

Тканевая специфичность экспрессии трансгена может быть обеспечена как тропизмом капсида к трансдукции определенного типа клеток, так и тканеспецифичностью промотора. Промоторы, обеспечивающие экспрессию трансгенов специфично в нейронах, даже у ААВ1 и ААВ2 (вирусов 1- и 2-го серотипа соответственно), часто используются в исследованиях с применением оптогенетических (Lanshakov et al., 2017 a, b) и хемогенетических (Dygalov et al., 2020) методов. Максимальный размер упакованного в ААВ генетического материала дает ограничения на все используемые технические последовательности, в том числе и промоторы, их размер в основном варьируется от 200 до 1500 п. н.

Синтетические промоторы на основе регуляторных последовательностей генов домашнего хозяйства, таких как *Pgk*, *Ubc*, *Gusb*, обеспечивают повсеместную экспрессию. В этом обзоре мы более подробно остановимся на промоторах, работающих в нервной ткани. Наиболее популярными промоторами, обеспечивающими экспрессию в нейронах, являются синапсиновый (*Syn*), кальций/кальмодулин-зависимой киназы II (*CamkII*), промотор MeCP2. Г. Фишелл с коллегами разработали промотор, активный в интернейронах

Таблица 1. Характеристика известных серотипов аденоассоциированных вирусов**Table 1.** Characteristics of known serotypes of adeno-associated viruses

Серотип	Посттрансляционные модификации	Рецептор	Тропизм к органам и тканям	Уникальные особенности
AAB1	–	Рецептор сиаловой кислоты; AAB рецептор (AAVR)	Скелетные мышцы, нейроны, глиальные клетки, эпендимальные клетки, сетчатка, эндотелиальные и сосудистые гладкие мышцы, сердце у мышей	–
AAB2	Множественные: убиквитинирование, фосфорилирование, SUMOилирование, гликозилирование множественных сайтов	Человеческий рецептор фактора роста фибробластов 1 (FGFR1); $\alpha V\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ интегрин; рецептор фактора роста гепатоцитов (HGFR); рецептор ламинина (LR); CD9	Ткани почек; гепатоциты; ткани сетчатки; клетки ЦНС; скелетные мышцы	Вектор данного вируса может быть помещен в капсид иного серотипа (1, 4, 5, 10 и 11) (Rabinowitz et al., 2002)
AAB3	Ацетилирование, фосфорилирование, гликозилирование	HSPG; FGFR1; LR; человеческий HGFR	Гепатоциты; опухолевые клетки печени человека; внутренние волосковые клетки улитки у мышей	–
AAB4	Убиквитинирование	α -2,3-О-связанная сиаловая кислота	ЦНС и эпендимальные клетки; почки, легкие, сердце у мышей	–
AAB5	Множественные: убиквитинирование, фосфорилирование, SUMOилирование, гликозилирование	Сиаловая кислота; рецепторы фактора роста тромбоцитов (PDGFR): корецепторы α и β	Множество типов нейронных клеток: клетки Пуркинью; звездчатые, корзинчатые клетки и нейроны Гольджи; клетки нижнего холмика и желудочкового эпителия; эпителий дыхательных путей; эндотелиальные клетки сосудов; гладкие мышцы	Требуется вирус простого герпеса (HSV) в качестве помощника; синтез полиаденилированного сайта в определенном локусе на основе регуляции активации промоторов генома вируса при помощи U1 (Qiu, Pintel, 2004)
AAB6	Ацетилирование	Сиалированные протеогликаны ($\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -связанная сиаловая кислота); рецептор фактора роста эпидермиса (EGFR)	Эпителий дыхательных путей, гепатоциты, скелетные мышцы, кардиомиоциты у мышей	–
AAB7	Множественные: гликозилирование, преимущественно с фосфорилированием, SUMOилирование, ацетилирование	–	Ткань коры головного мозга; ткань спинного мозга; сетчатка; гепатоциты	–
AAB8	Фосфорилирование, гликозилирование, ацетилирование	LR	Высокий тропизм к гепатоцитам у мышей, собак, нечеловекообразных обезьян; клетки поджелудочной железы, клетки канальцев и ткань почек, сетчатка у мышей	–
AAB9	Множественные: гликозилирование, фосфорилирование, SUMOилирование совместно с ацетилированием	Концевая N-связанная галактоза; интегрин с корецептором LR	Широкий спектр нейронных и ненейронных клеток ЦНС (астроциты, клетки сетчатки)	Высокая проницаемость через ГЭБ
AAB10	Множественные: гликозилирование и фосфорилирование совместно с убиквитинированием, SUMOилированием, ацетилированием	–	Клетки толстого и тонкого кишечника; гепатоциты, лимфоузлы, клетки почек и семенников у нечеловекообразных обезьян; клетки пигментированного эпителия сетчатки, ганглионарного слоя, фоторецепторы, горизонтальные клетки у мышей	Тропизм к клеткам сетчатки и другим типам клеток ЦНС, не характерным для AAB9

Окончание табл. 1
Table 1 (end)

Серотип	Посттрансляционные модификации	Рецептор	Тропизм к органам и тканям	Уникальные особенности
AAB11	–	GPR108 (по принадлежности к кладе AAV4) (Han et al., 2023)	Клетки кишечника, гепатоциты, лимфоузлы, клетки почек и семенников у нечеловекообразных обезьян; кора головного мозга и спинной мозг; проекторные нейроны и астроциты у мышей	–
AAB12	–	–	Слюнные железы и мышцы, эпителий носоглотки у мышей	–
AAB13	–	HSPG (Srivastava, 2016)	Малые ядра мозга (нейроны) (Han et al., 2022)	–

на основе промотора гена *Dlx* (Dimidschstein et al., 2016). Также показаны синтетические промоторы, специфичные для серотонинергических (Drozd, Lanshakov, 2020; Drozd et al., 2023) и норадренергических нейронов (Lanshakov, Sukhareva, 2020).

Экспрессия в остальных клетках нервной системы в большинстве работ обеспечивается благодаря промоторам: GFAP – для астроцитов, MBP – для олигодендроцитов. Для таргетирования на развивающиеся популяции клеток в ЦНС используются промоторы: SOX2 – для нейрональных предшественников и Olig2 – для предшественников олигодендроцитов (табл. 2).

Направленная молекулярная эволюция капсидов. Стратегии изменения тропизма

Как видно из табл. 1, капсиды серотипов AAB могут иметь тропизмы к достаточно широкому спектру тканей и клеток. Однако для достижения терапевтического эффекта часто требуется доставка в строго определенные типы клеток. Для реализации этой задачи применяют обычно два подхода: рациональный дизайн капсидов либо направленную эволюцию вирусных капсидов. Рациональный дизайн предполагает создание структурных модификаций в локализации специфических сайтов капсида на основе его структуры и биологических особенностей (Wang J.-H. et al., 2024). Рациональный дизайн осуществляется следующими способами: генетическими мутациями; инсерцией невирусных доменов в капсидные белки для изменения тропизма к тканям (объединение с рецепторами и одноцепочечными антителами); химическими модификациями.

Например, замена остатков тирозина и треонина на поверхности капсида в специфичных сайтах на фенилаланин и валин предотвращает деградацию соответствующих белков в цитоплазме клетки и увеличивает вероятность транспортировки вирусных частиц в ядро (Kanaan et al., 2017). В то же время полипептид, состоящий из 15 аминокислотных остатков и являющийся мишенью рецептора лютеинизирующего гормона (LH-R), способен при его инсерции в целевые сайты белков (VP1-3) капсида AAB повышать эффективность трансдукции целевого гена (в данном случае *lacZ*) в клетки яичников (OVCAR-3) и HeLa (Shi et al., 2001).

Существуют и иные способы повышения трансдукции вирусных частиц в клетки определенных тканей. В работе (Eichhoff et al., 2019) рассматриваются варианты объединения VP1 AAB2 с антителами альпак (VN-домена Ig, так называемые nanobody) с клеточноспецифичными белками (ARTC2.2, гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанный эктоэнзим Т-клеток (АДФ-рибозилтрансфераза) (Rissiek et al., 2018); CD38, трансмембранный и внутриклеточный белок (АДФ-рибозилциклаза и циклоADPR-гидролаза) большого разнообразия иммунных клеток (Piedra-Quintero et al., 2020); P2X7, лиганд-зависимый (внеклеточный АТФ) катионный канал широкого спектра клеток, в том числе иммунных, нейральных и глиальных, эндотелиальных и мышечных (Shokoples et al., 2021).

Эти белки играют роль факторов обеспечения отбора вирусных частиц по их тропизму к рецепторам соответствующих клеток. Встраивание VN-домена антитела происходило в GH2/GH3 поверхностную петлю VP1. В результате было обнаружено, что трансдукция генетических конструкций успешно осуществляется в клетки В-клеточной лимфомы человека CA46 (эндогенно экспрессирующие CD38); Т-клеточной лимфомы мыши Yac-1 (эндогенно экспрессирующие P2X7) при использовании вирусных частиц с капсидами AAB8, 9 и 1P5 (синтезирован с применением промотора P5), содержащих VN-домены антител (Eichhoff et al., 2019).

Примером химической модификации может служить модификация гуанидиновых остатков на поверхности капсида с участием метилглиоксаля с получением гидроимидазолоновых производных. Данная модификация приводит к снижению тропизма к тканям печени и повышению тропизма к нейрональным клеткам ЦНС (Horowitz et al., 2011).

Направленная эволюция вирусных капсидов заключается в обеспечении условий мутационной изменчивости вирусных частиц при помощи рандомизированной генерации химерных капсидов (Wang D. et al., 2019) с их отбором по целевым характеристикам, например, путем инкубации с раствором очищенных человеческих иммуноглобулинов против определенных серотипов вирусных химерных капсидов (AAB2, AAB8, AAB9) с последующим отбором их посредством амплификации в гепатоцитах. Это необходимо

Таблица 2. Сравнение общеиспользуемых промоторов, применяемых в векторах аденоассоциированных вирусов
Table 2. Comparison of the commonly used promoters, which are applied in adeno-associated viral vectors

Промотор	Тканеспецифичность	Относительная «сила»	Размер (п. н.)	Литературный источник
CMV	Универсальный	+++	750–800	Xu et al., 2001
СВА (включая производные: CAG, CBh и др.)	Универсальный	+	248–1600	Gray et al., 2011
EF-1a	Универсальный	+	2500	Gilham et al., 2010
PGK	Универсальный	++	426	Gilham et al., 2010
UBC	Универсальный	+	403	Qin et al., 2010
GUSB (hGBp)	Универсальный	+	378	Husain et al., 2009
UCOE (промотор IINRPA2B1-CBX3)	Универсальный	++	600–2500	Antonioni et al., 2013
hAAT	Печень	++	347–1500	Cunningham et al., 2008
TBG	Печень	++	400	Yan et al., 2012
Десмин	Скелетные мышцы	+++	1700	Talbot et al., 2010
МСК	Скелетные мышцы	++	595–1089	Katwal et al., 2013
C5-12	Скелетные, сердечные и диафрагмальные мышцы	++	312	Wang B. et al., 2008
NSE	Нейроны	+++	300–2200	Xu et al., 2001
Синапсин	Нейроны	+	470	Kuroda et al., 2008
PDGF	Нейроны	+++	1400	Hioki et al., 2007
МесP2	Нейроны	+	229	Gray et al., 2011
CaMKII	Нейроны	++	364–2300	Kuroda et al., 2008
mGluR2	Нейроны	+	1400	Kuroda et al., 2008
NFL	Нейроны	+	650	Xu et al., 2001
NFH	Нейроны	+	920	Xu et al., 2001
np2	Нейроны	+	650	Xu et al., 2001
PPE	Нейроны	+	2700	Xu et al., 2001
Enk	Нейроны	+	412	Xu et al., 2001
EAAT2	Нейроны и астроциты	++	966	Kuroda et al., 2008
GFAP	Астроциты	+	681–2200	Dirren et al., 2014
MBP	Олигодендроциты	++	1900	Chen et al., 1998

Примечание. Тканеспецифичность, относительная экспрессивность (+ наиболее низкая, +++ наиболее высокая среди приведенных); размер и соответствующие ссылки приведены для общеиспользуемых промоторов.

Note. Tissue specificity, relative expressivity (+ is the lowest, +++ is the highest among those listed); size, and relevant references are given for commonly used promoters.

для снижения иммуногенности вируса и повышения его тропизма к клеткам печени (Grimm et al., 2008).

Иногда отдельно выделяют также эволюцию капсидов *in silico*, т. е. детальное компьютерное моделирование капсидов и получаемых измененных вариантов. Так, E. Zinn с коллегами (2015) выделили наиболее вероятного предка функционально значимых серотипов AAV (AAV1, 2, 8 и 9) как часто используемых в клинических экспериментах. Кроме того, выбранный кандидат был филогенетически близок к представителям *Dependoviridae*, что позволяло предположить его применимость к исследованиям на приматах. Было продемонстрировано сопоставимое качество доставки генов в клетки печени и селезенки с помощью AAV8. Эта работа показывает применимость эволюционного анализа для установления структурно-функциональной схожести серотипов вирусов, в том числе искусственно синтезированных.

Один из распространенных способов создания вирусных библиотек для последующего отбора необходимых

по свойствам вирусных линий – химеризация имеющихся генетических конструкций (в частности, генов *rep* и *cap*). Данному методу посвящена работа (Koerber et al., 2008) по получению вирусов с заданным тропизмом к клеткам. Генерация осуществлялась методом перетасовки ДНК (DNA shuffling), который заключается в разделении ДНК (заданного участка или гена) на фрагменты, их очистке и, далее, соединении разных фрагментов ДНК данного участка методом ПЦР без использования праймеров (Stemmer, 1994). Так, при соединении генов *rep*, полученных от разных серотипов вируса, можно добиться создания химерного капсида. Затем указанные химерные вирусные частицы трансфицируются в AAV-компетентные клетки (например, в AAV293 – клетки эмбриональной почки человека), после чего созданными вирусными частицами обрабатываются клеточные линии с нужными исследователю свойствами и оценивается уровень трансдукции вектора в данные клетки (Koerber et al., 2008). D.G.R. Tervo с коллегами (2016) получили химерные

капсиды серотипов AAV (AAB1, 2, 4, 5, 6, 8, 9) с применением метода генетической перетасовки, варианты гена *cap* AAB2 со случайными вставками петель и определенных локусов. Данные рекомбинантные копии вирусных частиц отбирались для осуществления ретроградного нейронального транспорта генов и, соответственно, осуществления адресной доставки необходимых векторов в нужные участки сложных нейронных сетей на основе неоднородности популяций нейронов.

Химерные капсиды способны наследовать свойства родительских форм. Например, В. Nauck с коллегами (2003) создавали химерный вектор серотипов AAB1 и 2. Вирусы AAB1 обладают тропизмом к мышечной ткани, AAB2 – к ткани печени. Эти исследователи показали, что использование разных соотношений хелперных плазмид во время трансдукции для капсидов разных серотипов напрямую связано с соотношением количества белковых элементов данных двух серотипов, содержащихся в результирующем капсиде (эксперименты с эффективностью осаждения вирусных частиц на колонке с соответствующими одному из серотипов и нейтрализации антителами к данным серотипам). Однако экспериментальные процедуры, оценивающие эффективность доставки AAV генов фактора свертывания крови IX и $\alpha 1$ -антитрипсина в клетки, отвечающие разным тропизмам обоих серотипов, показали, что эффективность доставки наиболее высока при использовании именно химерных вариантов капсидов. Данный факт свидетельствует о способности химерных капсидов наследовать свойства обоих предковых серотипов.

Отдельного внимания заслуживают методы конструирования капсидов с помощью рекомбиназы Cre-lox (Chan et al., 2017), которые используют loxP-концевые сайты для рекомбинации и/или инактивации целевого гена. С применением этого подхода были разработаны капсиды, трансдуцирующие нейроны ЦНС при внутривенном введении вирусных частиц. Кроме того, рекомбиназа Cre-lox может в процессе активировать ген флуоресцентного белка, место экспрессии которого далее идентифицируется методами флуоресцентной микроскопии, благодаря чему устанавливаются особенности тропизма вектора AAV к малоразмерным анатомическим структурам, например ядрам головного мозга (Deverman et al., 2016).

Решение проблемы вместимости генной кассеты

Одним из главных недостатков AAV является их способность упаковывать ДНК размером лишь ≈ 4.7 – 5.2 кб (Bennett et al., 2017), что ограничивает их применение. Однако существуют работы, демонстрирующие возможность трансдукции протяженных трансгенов, преодолевающих этот предел при высоком титре за счет рекомбинации разделенного генетического материала при упаковке. С учетом того, что для эффективной экспрессии генов необходимы регуляторные элементы в дополнение к терапевтической кодирующей последовательности (CDS), остро стоит вопрос об увеличении вместимости генной кассеты AAV. Сравнивая возможности других вирусов, можно сказать, что аденовирусные векторы способны доставлять последовательности до 37 кб (с использованием помощника) (Wang J.-H. et al., 2024), лен-

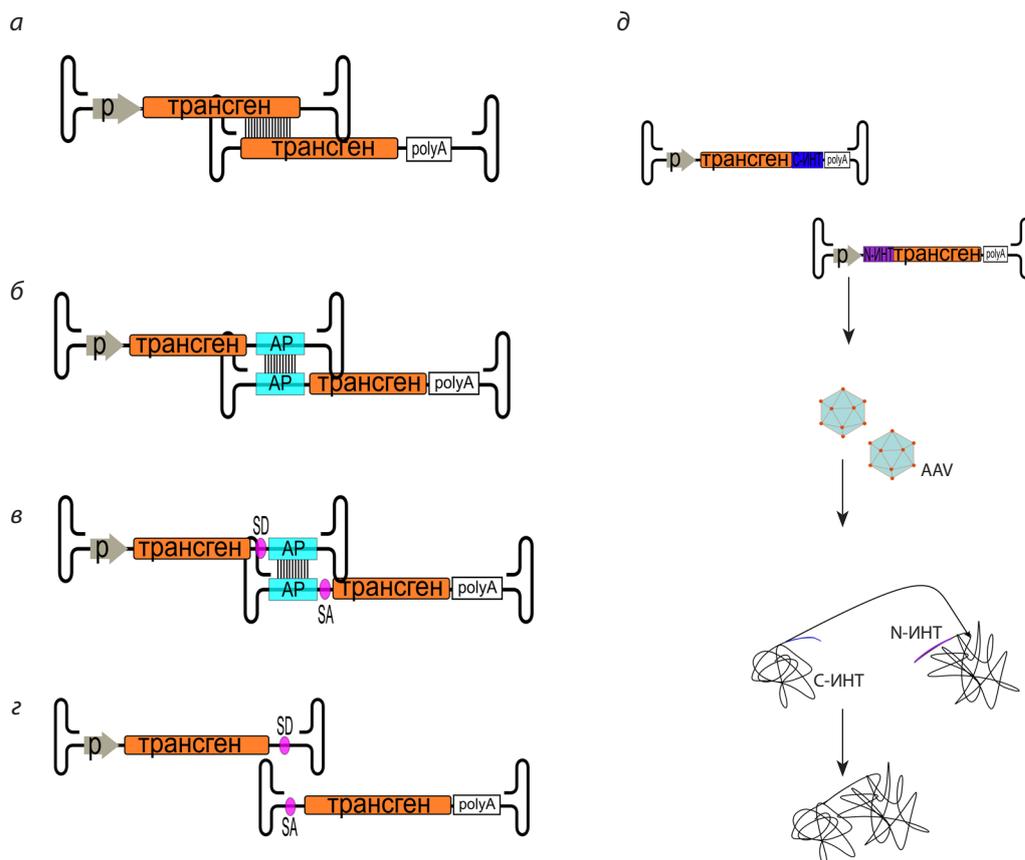
тивирусы – свыше 9 кб (Bulcha et al., 2021), вирус простого герпеса (HSV-1) – свыше 30 кб (Jerusalinsky et al., 2012). В то же время иные способы доставки предполагают еще более значительную вместимость векторных геномов (от 100 кб для фага P1 до 2 Мб для искусственных хромосом дрожжей (YAC) (Bajrai, 2014). Способы решения данной проблемы могут быть связаны с изменением вирусной частицы или оптимизацией самого генетического вектора. Оптимизация вектора может быть достигнута поиском не имеющих важного значения участков последовательности продукта гена либо отказом от каких-либо посттранскрипционных регуляторов. Однако данная стратегия не всегда является лучшим вариантом.

Чтобы преодолеть это ограничение, длинную открытую рамку считывания CDS можно разбить и поместить в отдельные AAV-векторы, которые при совместной трансдукции одной и той же клетки-мишени восстанавливают полную размерную кассету экспрессии трансгена или белка. Этот подход можно разделить на два больших класса: первый, основанный на рекомбинации концевых повторов и высококорекombинирующих последовательностей ДНК (см. рисунок, а–з), а также транс-сплайсинге, и второй, использующий трансбелковый сплайсинг (см. рисунок, д).

Транс-сплайсинг заключается в разделении регуляторного элемента транскрипции или трансгена на две части с их упаковкой в две вирусные частицы. Коинфицирование двумя вирусами приводит к реконструкции цельной кассеты посредством межмолекулярной конкатемеризации, опосредованной инвертированными терминальными повторами. То есть происходит гетеродимеризация, обеспечивающая экспрессию полноразмерного трансгена или увеличение экспрессии трансгена (через cis-активацию).

В рамках первой стратегии большая экспрессионная кассета разделяется на два генома AAV (двойной AAV, см. рисунок), каждый из них содержит одну половину экспрессионной кассеты: 5'-вектор содержит как промотор, так и 5'-половинку CDS, в то время как 3'-вектор – 3'-половинку CDS с сигналом полиаденилирования (см. рисунок, а). Рекомбинация двух векторов и восстановление полноразмерной экспрессионной кассеты происходят либо посредством: (1) последовательностей трансгена, которые повторяются как в конце 5'-вектора, так и в начале 3'-вектора и запускают гомологичную рекомбинацию (перекрывающийся двойной AAV) (см. рисунок, а) (Duan et al., 2001); (2) инвертированных концевых повторов AAV (ITR), которые по своей природе подвергаются межмолекулярной рекомбинации, таким образом, опосредуя конкатемеризацию двух разных геномов AAV (Yan et al., 2000) (не показано); (3) последовательностей с донором и акцептором транс-сплайсинга (см. рисунок, в) или (4) экзогенных коротких высококорекombинантных последовательностей, включенных как в конце 5'-вектора, так и в начале 3'-вектора, которые способствуют объединению двух геномов «голова к хвосту» (AK-последовательность фага F1 и AP1- и AP2-последовательности плацентарной щелочной фосфатазы) (см. рисунок, б, з).

Возможно также объединение последовательностей и подходов, например, высококорекombинирующих последова-



Общая схема объединения трансгенов AAV при использовании метода раздельной доставки вирусных векторов.

Варианты механизмов постинфекционного объединения вирусных трансгенов при использовании: *a* – перекрывающейся части трансгенов; *б* – высокорекombинирующих последовательностей гена щелочной фосфатазы AP; *в* – AP-сайтов совместно с донорами SD и акцепторами SA сплайсинга; *г* – транс-сплайсинга; *д* – трансбелкового сплайсинга между пептидными N- и C-концами

Scheme of AAV transgenes integration using the viral vectors separate delivery method.

Methods for postinfection doubled transgene integration in viral transgenes using: *a* – overlapping part of transgenes; *b* – high recombined sequences in AP alkaline phosphatase gene; *c* – AP-sites together with specific donor and acceptor sequences; *d* – trans-splicing; *e* – transprotein splicing between peptide N- and C-termini

тельностью вместе с сайтами транс-сплайсинга (гибридный, двойной AAV) (Ghosh et al., 2008).

Гомологичная рекомбинация в соматических клетках происходит крайне редко, поэтому очевидно, что наиболее успешными являются гибридные стратегии с использованием транс-сплайсинга. Показана успешная трансдукция генетического материала размером 10 кб, разделенного на два AAV-вируса, и 14 кб – разделенного на три вирусные частицы (Maddalena et al., 2018).

Вторая стратегия основана на белковом сплайсинге, который был открыт в 1990 г. (Wang H. et al., 2022). Это процесс вырезания внутреннего пептида интенеина и лигирования внешних пептидов эктенеинов (см. рисунок, д). Примечательно, что он автокаталитический и не требует дополнительных кофакторов.

Интенеины и эктенеины функциональны. Интенеины чаще всего имеют эндонуклеазную активность, обеспечивающую горизонтальный перенос и «хоуминг» последовательностей, кодирующих их. Эктенеины – это чаще всего ферменты со своими определенными функциями. Когда интенеин находится на разных полипептидных цепях, в окон-

чании первого полипептида и в начале следующего, происходит лигирование двух разных цепей эктенеинов, т. е. трансбелковый сплайсинг. Как раз такой механизм используется для объединения пептидных цепей, закодированных в двух разных AAV-вирусах. Отличие от первого варианта состоит в том, что в обоих векторах должны быть промоторы, последовательности Козак и полиА, чтобы обеспечить трансляцию и образование белкового продукта.

Несмотря на то что выбранные стратегии позволяют увеличить размер доставляемого трансгена, они имеют недостатки, причем общие. Экспрессия укороченных пептидов с одного из векторов может иметь доминантно-негативный или токсический эффект, что возможно преодолеть добавлением сигнальных последовательностей деградации, которые не присутствуют после окончательной сборки. Для РНК это могут быть тандемно повторенные сайты связывания miРНК: miR-let7b, miR-26a, miR-124, miR-204, а для пептидов – дополнительные повторенные стоп-кодона, CL1 дегрон, PB29 дегрон, PEST-сигнал, сшивка с убиквитином (Trapani et al., 2015).

D. Duan с коллегами (2001) исследовали эффективность доставки вектора гена *lacZ* при помощи соединения генов

в клетке *Escherichia coli* тремя способами: перекрываемым сплайсингом (перекрываются области инвертированных повторов, которые удаляются при сплайсинге в клетке), гомологичной рекомбинацией (перекрываются части самой последовательности кДНК) и доставкой цельного гена. Было выявлено, что доставка методом транс-сплайсинга (перекрываемого) менее эффективна, чем доставка цельного гена (15.8 % по уровню экспрессии β -галактозидазы), но более эффективна, чем использование гомологичной рекомбинации для объединения частей гена (трехкратное превышение по уровню экспрессии β -галактозидазы). Преодоление снижения эффективности трансдукции может осуществляться путем оптимизации регуляторных элементов, триплетов и поиском функционально значимых доменов.

Клинические испытания и использование ААВ в терапии

Первые практические результаты были получены уже на фазе I клинических испытаний в 1996 г. при лечении пациентов с цистозным фиброзом путем доставки функциональной копии гена *CFTR*. В 2012 г. Европейское агентство лекарственных средств (European Medicines Agency, EMA) одобрило первый препарат ААВ-терапии Glybera, который содержал рекомбинантный продукт ААВ, доставляющий ген липопротеинлипазы человека (*LPL*) для лечения наследственной недостаточности липопротеинлипазы (LPLD). Одним из последних одобренных препаратов является Zolgensma (*Zonasemnogene aberarvovec*), зарегистрированный в 2019 г., содержащий продукт ААВ, который включает в себя функциональную копию гена *SMN1* для лечения спинально-мышечной атрофии 1-го типа (SMA1) (He et al., 2021).

Проведен также ряд исследований для изучения терапевтического потенциала ААВ-доставки генов в центральную нервную систему для лечения различных неврологических заболеваний. Первоначально гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) был препятствием на пути продуктов ААВ к мишени, однако в 2009 г. K.D. Foust с коллегами сообщили об успешной доставке гена *GFP* (green fluorescent protein) при внутривенном введении ААВ9 (серотип 9) в головной и спинной мозг (Foust et al., 2009).

Значительное количество работ посвящено также поиску методов лечения гемофилии А- и В-типов. Для достижения данной цели предлагалось оптимизировать доставку генов факторов свертывания крови FVIII и FXI соответственно для этих двух типов гемофилий. В 1997 г. впервые проведены процедуры, позволившие обеспечить стабильную экспрессию человеческого фактора свертывания крови FIX (hFIX) с применением рекомбинантного ААВ, путем внутримышечного введения инъекции или использования для этой цели воротной вены печени (Wang J.-H. et al., 2024). Исследователи сталкивались с рядом трудностей при его трансдукции. Так, было отмечено наличие иммунного ответа при умеренных дозах введения ААВ-доставщиков: антитела вырабатывались в ответ как на введение капсидов (ААВ8), так и на наличие в крови последовательности гена *FIX* (Nathwani et al., 2011). Кроме того, повышение активности *FIX* было низким (до 2–11 % от физиологически нормального от < 1 %

изначального) (Nathwani et al., 2011). Эти проблемы были решены путем оптимизации кодонов и тропизма капсида к клеткам печени (Wang J.-H. et al., 2024). Таким образом, в 2022 г. на рынке появился препарат Hemgenix для терапии гемофилии В на основе рекомбинантного капсида ААВ5 с измененной последовательностью *FIX* (R338L), способный увеличивать активность фермента до 40-кратного показателя (George et al., 2017).

Препарат для терапии гемофилии А, Roctavian, был одобрен FDA уже в 2023 г. (Wang J.-H. et al., 2024). На пути к получению функционального синтеза физиологически нормального фактора FVIII также возник ряд проблем: крупная длина трансгена FVIII для ААВ-доставки (порядка 7 кб) и снижение синтеза FVIII в организме пациентов со временем (приблизительно через два года) (George et al., 2021). Данные преграды были преодолены путем делеции части последовательности FVIII, в результате чего конечный вектор содержит только усеченный В-домен; использованием тканеспецифичного промотора (Mahlangu et al., 2023) TTR; оптимизации кодонов (снижение использования CpG-последовательностей по сравнению исходным FVIII) с уменьшением разнообразия аминокислот (патент США US20170216408A1 (Anguela, Shen, 2016)).

В 2017 г. был одобрен препарат для терапии врожденного амавроза Лебера – заболевания, связанного с деградацией светочувствительных элементов сетчатки при недостатке белка RPE (ген *RPE65*, полная трансретинизомераза). Модификации вектора ААВ2 заключались в добавлении последовательности Козак (место старта трансляции); промотора гибридного β -актина курицы (CBA) с CBA-экзоном; быстрого раннего энхансера цитомегаловируса (cytomegalovirus immediate early enhancer). В данном случае потребовалось увеличение длины последовательности на 6.5 кб одноцепочечной ДНК вируса для предотвращения неправильной упаковки ААВ (что привело бы к отсутствию включения трансгена в состав капсида) (Bennicelli et al., 2008).

Заболеванием, связанным с поражением нервной системы, для лечения которого одобрен соответствующий препарат, является дефицит декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДДАА) (ген *DDC*). Данный фермент ответственен за синтез нейромедиаторов дофамина и серотонина из конечных предшественников (Kondakova et al., 2022). Это приводит к комбинированному дефициту серотонина, дофамина, норадреналина и адреналина (Wang J.-H. et al., 2024). Более 70 % клинических случаев этого заболевания носит тяжелую форму (Kondakova et al., 2022).

Успешное обеспечение синтеза дофамина реализуется при адресной доставке гена *DDC* к дофаминергическим нейронам черной субстанции и вентральной области покрышки среднего мозга, что потребовало дополнительных решений по оптимизации трансдукции. Был разработан план инъекции препарата Upstaza, содержащего ААВ2-hDDC, в область хвостатого ядра с подобранной дозировкой и координатами введения. Данная проблема является сложноразрешимой, поскольку существует погрешность при введении канюли в области мозга и, кроме того, часть вирусных частиц может перемещаться в смежные области мозга, введение вне ЦНС не представляется возможным. Напри-

мер, W.A. Liguore с коллегами (2019) исследовали влияние выбранных путей введения рекомбинантного вируса (внутрисосудистое и в спинномозговую жидкость) на эффективность трансдукции целевого вектора в такие области головного мозга, как лобная и моторная кора, полосатое тело, таламус и мозжечок. Для этой задачи был создан вектор AAV-PHP.B, представляющий собой AAV9, содержащий часть промотора р41 (1680–1974) и сплайсинговые последовательности AAV2, с капсидом, имеющим 7-аминокислотную вставку (TLAVPFK) между позициями 588 и 589 (Deverman et al., 2016). Было установлено, что выбранные пути введения препарата вирусных частиц влияют на количество копий вирусного генома в клетках. Также существенно различалось количество вирусных геномов при разных дозах введенного препарата. Выяснено, что трансдукция с помощью данного вектора одинаково эффективна при внутрисосудистом введении, но снижается при проходе крови через печень и селезенку и гематоэнцефалический барьер (Liguore et al., 2019). Другой проблемой была обозначена потенциальная канцерогенность метода доставки, что потребовало дополнительных испытаний препарата.

Следует отметить, что одна из проблем безопасности терапевтических препаратов на основе AAV-доставки – их потенциальная токсичность для организма человека при определенных условиях. Например, в сообщении в “Nature Biotechnology” (High-dose AAV gene therapy deaths, 2020) отмечаются случаи гепатотоксичности высоких доз препарата AT132 (лечение X-связанной тубулярной миопатии) (3×10^{14} вирусных геномов/кг массы тела) у пациентов с ранее отмеченными заболеваниями печени. Данный процесс, вероятно, – следствие иммунного CD8 T-клеточного ответа на презентацию капсидов AAV гепатоцитами посредством МНС (Kohn et al., 2023). Роль антигенов также могут выполнять неметилированные CpG-участки или трансгенный белок. Основными побочными эффектами в таком случае выступают тромбальная микроангиопатия или атипичский гемолитический уремический синдром (Kohn et al., 2023). С учетом факта, что от 30 до 70 % взрослого населения обладает иммуногенностью к дТААВ (Kohn et al., 2023), у 59 % обнаружены NAb (Au et al., 2022). Всего по состоянию на 2022 г. зафиксировано 11 летальных исходов вследствие воздействия терапевтических препаратов на основе AAV. При этом в 30 % клинических испытаний были выявлены тяжелые клинические побочные эффекты. Кроме указанных выше патологий, отмечено также нейротоксическое воздействие терапевтических аденоассоциированных вирусов.

Заключение

В настоящем обзоре рассмотрены основные достижения молекулярной биологии, связанные с использованием аденоассоциированной вирусной доставки генов, позволяющей надеяться на излечение большего количества заболеваний, как наследственных, так и другой этиологии. За последнее десятилетие на рынке появилось семь препаратов AAV-терапии, успешно применяемых для лечения генетических заболеваний. Учитывая широкий спектр описываемых возможностей модификации вирусных частиц, связанных с точной оптимизацией их тропизма в тканях, методами сни-

жения иммуногенности и использования разнообразных регуляторных механизмов, можно предположить более активное применение метода AAV-доставки в терапевтических и научно-практических целях.

Список литературы / References

- Anguela X., Shen S.H.-I. CpG reduced factor viii variants, compositions and methods and uses for treatment of hemostasis disorders (U.S. Patent No. US20170216408A1). U.S. Patent and Trademark Office, 2016. <https://patents.google.com/patent/US20170216408A1/en>
- M.N., Skipper K.A., Anakok O. Optimizing retroviral gene expression for effective therapies. *Hum. Gene Ther.* 2013;24(4):363-374. doi 10.1089/hum.2013.062
- Au H.K.E., Isalan M., Mielcarek M. Gene therapy advances: A meta-analysis of AAV usage in clinical settings. *Front. Med.* 2022;8:809118. doi 10.3389/fmed.2021.809118
- Bajpai B. High Capacity Vectors. In: Ravi I., Baunthiyal M., Saxena J. (Eds). *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Springer, 2014;1-10. doi 10.1007/978-81-322-1554-7_1
- Bennett A., Mietzsch M., Agbandje-McKenna M. Understanding capsid assembly and genome packaging for adeno-associated viruses. *Future Virol.* 2017;12(6):283-297. doi 10.2217/fvl-2017-0011
- Bencicelli J., Wright J.F., Komaromy A., Jacobs J.B., Hauck B., Zelenia O., Mingozzi F., Hui D., Chung D., Rex T.S., Wei Z., Qu G., Zhou S., Zeiss C., Arruda V.R., Acland G.M., Dell’Osso L.F., High K.A., Maguire A.M., Bennett J. Reversal of blindness in animal models of Leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol. Ther.* 2008;16(3):458-465. doi 10.1038/sj.mt.6300389
- Bijlani S., Pang K.M., Sivanandam V., Singh A., Chatterjee S. The role of recombinant AAV in precise genome editing. *Front. Genome Ed.* 2022;3:799722. doi 10.3389/fgeed.2021.799722
- Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021;6(1):53. doi 10.1038/s41392-021-00487-6
- Chan K.Y., Jang M.J., Yoo B.B., Greenbaum A., Ravi N., Wu W.-L., Sánchez-Guardado L., Lois C., Mazmanian S.K., Deverman B.E., Gradinaru V. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* 2017;20(8):1172-1179. doi 10.1038/nn.4593
- Chen H., McCarty D., Bruce A., Suzuki K., Suzuki K. Gene transfer and expression in oligodendrocytes under the control of myelin basic protein transcriptional control region mediated by adeno-associated virus. *Gene Ther.* 1998;5(1):50-58. doi 10.1038/sj.gt.3300547
- Cunningham S.C., Dane A.P., Spinoulas A., Alexander I.E. Gene delivery to the juvenile mouse liver using AAV2/8 vectors. *Mol. Ther.* 2008;16(6):1081-1088. doi 10.1038/mt.2008.72
- Deverman B.E., Pravdo P.L., Simpson B.P., Kumar S.R., Chan K.Y., Banerjee A., Wu W.-L., Yang B., Huber N., Pasca S.P., Gradinaru V. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(2):204-209. doi 10.1038/nbt.3440
- Dimidschstein J., Chen Q., Tremblay R., Rogers S.L., Saldi G.A., Guo L., Xu Q., Liu R., Lu C., Chu J., Grimley J.S., Krostag A.R., Kaykas A., Avery M.C., Rashid M.S., Baek M., Jacob A.L., Smith G.B., Wilson D.E., Kosche G., Kruglikov I., Rusielewicz T., Kotak V.C., Mowery T.M., Anderson S.A., Callaway E.M., Dasen J.S., Fitzpatrick D., Fossati V., Long M.A., Noggle S., Reynolds J.H., Sanes D.H., Rudy B., Feng G., Fishell G. A viral strategy for targeting and manipulating interneurons across vertebrate species. *Nat. Neurosci.* 2016;19(12):1743-1749. doi 10.1038/nn.4430. Epub 2016 Oct 31. Update in: *Nat. Neurosci.* 2017;Jun 27;20(7):1033. doi 10.1038/nn0717-1033d. Erratum in: *Nat. Neurosci.* 2017;20(7):1033. doi 10.1038/nn0717-1033c. PMID: 27798629; PMCID: PMC5348112
- Dirren E., Towne C.L., Setola V., Redmond D.E., Schneider B.L., Aebischer P. Intracerebroventricular injection of adeno-associated virus 6 and 9 vectors for cell type-specific transgene expression in the spinal cord. *Hum. Gene Ther.* 2014;25(2):109-120. doi 10.1089/hum.2013.021
- Drozdz U.S., Lanshakov D.A. Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump. *Integr. Physiol.* 2020;1(2):144-146. doi 20200717151143357
- Drozdz U.S., Lanshakov D.A., Dygalo N.N. Dorsal raphe nucleus serotonergic neuron activity is necessary for the manifestation of the anti-

- depressant effect of ketamine. *Neurochem. J.* 2023;17(3):394-401. doi 10.1134/S181971242303008X
- Duan D., Yue Y., Engelhardt J.F. Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: A quantitative comparison. *Mol. Ther.* 2001;4(4):383-391. doi 10.1006/mthe.2001.0456
- Dygalo N.N., Lanshakov D.A., Komysheva N.P., Drozd U.S., Shaburova E.V., Sukhareva E.V., Shishkina G.T. Chemogenetic activation of glutamatergic neurons in the juvenile rat cortex reduces anxiety. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020;490(1):16-18. doi 10.1134/S1607672920010056
- Eichhoff A.M., Börner K., Albrecht B., Schäfer W., Baum N., Haag F., Körbelin J., Trepel M., Braren I., Grimm D., Adriouch S., Koch-Nolte F. Nanobody-enhanced targeting of AAV gene therapy vectors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019;15:211-220. doi 10.1016/j.omtm.2019.09.003
- Flotte T.R., Afione S.A., Conrad C., McGrath S.A., Solow R., Oka H., Zeitlin P.L., Guggino W.B., Carter B.J. Stable *in vivo* expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90(22):10613-10617. doi 10.1073/pnas.90.22.10613
- Foust K.D., Nurre E., Montgomery C.L., Hernandez A., Chan C.M., Kasper B.K. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotechnol.* 2009;27(1):59-65. doi 10.1038/nbt.1515
- George L.A., Sullivan S.K., Giermasz A., Rasko J.E.J., Samelson-Jones B.J., Ducore J., Cuker A., Sullivan L.M., Majumdar S., Teitel J., McGuinn C.E., Ragni M.V., Luk A.Y., Hui D., Wright J.F., Chen Y., Liu Y., Wachtel K., Winters A., Tiefenbacher S., Arruda V.R., Van Der Loo J.C.M., Zelenia O., Takefman D., Carr M.E., Couto L.B., Anguela X.M., High K.A. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(23):2215-2227. doi 10.1056/NEJMoa1708538
- George L.A., Monahan P.E., Eyster M.E., Sullivan S.K., Ragni M.V., Croteau S.E., Rasko J.E.J., Recht M., Samelson-Jones B.J., MacDougall A., Jaworski K., Noble R., Curran M., Kuranda K., Mingozi F., Chang T., Reape K.Z., Anguela X.M., High K.A. Multiyear factor VIII expression after AAV gene transfer for hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2021;385(21):1961-1973. doi 10.1056/NEJMoa2104205
- Ghosh A., Yue Y., Lai Y., Duan D. A hybrid vector system expands adeno-associated viral vector packaging capacity in a transgene-independent manner. *Mol. Ther.* 2008;16(1):124-130. doi 10.1038/sj.mt.6300322
- Gilham D.E., Lie-A-Ling M., Taylor N., Hawkins R.E. Cytokine stimulation and the choice of promoter are critical factors for the efficient transduction of mouse T cells with HIV-1 vectors. *J. Gene Med.* 2010;12(2):129-136. doi 10.1002/jgm.1421
- Gray S.J., Foti S.B., Schwartz J.W., Bachaboina L., Taylor-Blake B., Coleman J., Ehlers M.D., Zylka M.J., McCown T.J., Samulski R.J. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum. Gene Ther.* 2011;22(9):1143-1153. doi 10.1089/hum.2010.245
- Greig J.A., Martins K.M., Breton C., Lamontagne R.J., Zhu Y., He Z., White J., Zhu J.-X., Chichester J.A., Zheng Q., Zhang Z., Bell P., Wang L., Wilson J.M. Integrated vector genomes may contribute to long-term expression in primate liver after AAV administration. *Nat. Biotechnol.* 2024;42(8):1232-1242. doi 10.1038/s41587-023-01974-7
- Grimm D., Lee J.S., Wang L., Desai T., Akache B., Storm T.A., Kay M.A. *In vitro* and *in vivo* gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J. Virol.* 2008;82(12):5887-5911. doi 10.1128/JVI.00254-08
- Hamilton H., Gomos J., Berns K.I., Falck-Pedersen E. Adeno-associated virus site-specific integration and AAVS1 disruption. *J. Virol.* 2004;78(15):7874-7882. doi 10.1128/JVI.78.15.7874-7882.2004
- Han Z., Luo N., Wu Y., Kou J., Ma W., Yang X., Cai Y., Ma L., Han L., Wang X., Qin H., Shi Q., Wang J., Ye C., Lin K., Xu F. AAV13 enables precise targeting of local neural populations. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(21):12806. doi 10.3390/ijms232112806
- Han Z., Luo N., Ma W., Liu X., Cai Y., Kou J., Wang J., Li L., Peng S., Xu Z., Zhang W., Qiu Y., Wu Y., Ye C., Lin K., Xu F. AAV11 enables efficient retrograde targeting of projection neurons and enhances astrocyte-directed transduction. *Nat. Commun.* 2023;14(1):3792. doi 10.1038/s41467-023-39554-7
- Hauck B., Chen L., Xiao W. Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol. Ther.* 2003;7(3):419-425. doi 10.1016/S1525-0016(03)00012-1
- He X., Urip B.A., Zhang Z., Ngan C.C., Feng B. Evolving AAV-delivered therapeutics towards ultimate cures. *J. Mol. Med.* 2021;99(5):593-617. doi 10.1007/s00109-020-02034-2
- Higashimoto T., Urbinati F., Perumbeti A., Jiang G., Zarzuela A., Chang L.-J., Kohn D.B., Malik P. The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element reduces readthrough transcription from retroviral vectors. *Gene Ther.* 2007;14(17):1298-1304. doi 10.1038/sj.gt.3302979
- High-dose AAV gene therapy deaths. *Nat. Biotechnol.* 2020;38(8):910. doi 10.1038/s41587-020-0642-9
- Hioeki H., Kameda H., Nakamura H., Okunomiya T., Ohira K., Nakamura K., Kuroda M., Furuta T., Kaneko T. Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters. *Gene Ther.* 2007;14(11):872-882. doi 10.1038/sj.gt.3302924
- Hollensen A.K., Thomsen R., Bak R.O., Petersen C.C., Ermegaard E.R., Aagaard L., Damgaard C.K., Mikkelsen J.G. Improved microRNA suppression by WPRE-linked tough decoy microRNA sponges. *RNA.* 2017;23(8):1247-1258. doi 10.1261/rna.061192.117
- Horowitz E.D., Weinberg M.S., Asokan A. Glycated AAV vectors: chemical redirection of viral tissue tropism. *Bioconjug. Chem.* 2011;22(4):529-532. doi 10.1021/bc100477g
- Husain T., Passini M.A., Parente M.K., Fraser N.W., Wolfe J.H. Long-term AAV vector gene and protein expression in mouse brain from a small pan-cellular promoter is similar to neural cell promoters. *Gene Ther.* 2009;16(7):927-932. doi 10.1038/gt.2009.52
- Issa S.S., Shaimardanova A.A., Solovyeva V.V., Rizvanov A.A. Various AAV serotypes and their applications in gene therapy: An overview. *Cells.* 2023;12(5):785. doi 10.3390/cells12050785
- Jerusalinsky D., Baez M.V., Epstein A.L. Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for fundamental research in neurosciences and gene therapy of neurological diseases. *J. Physiol. Paris.* 2012;106(1-2):2-11. doi 10.1016/j.jphysparis.2011.11.003
- Johnson F.B., Ozer H.L., Hoggan M.D. Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *J. Virol.* 1971;8(6):860-863. doi 10.1128/jvi.8.6.860-863.1971
- Kanaan N.M., Sellnow R.C., Boye S.L., Coberly B., Bennett A., Agbandje-McKenna M., Sortwell C.E., Hauswirth W.W., Boye S.E., Manfredson F.P. Rationally engineered AAV capsids improve transduction and volumetric spread in the CNS. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2017;8:184-197. doi 10.1016/j.omtn.2017.06.011
- Katwal A.B., Konkalmatt P.R., Piras B.A., Hazarika S., Li S.S., John Lye R., Sanders J.M., Ferrante E.A., Yan Z., Annex B.H., French B.A. Adeno-associated virus serotype 9 efficiently targets ischemic skeletal muscle following systemic delivery. *Gene Ther.* 2013;20(9):930-938. doi 10.1038/gt.2013.16
- Koerber J.T., Jang J.-H., Schaffer D.V. DNA shuffling of adeno-associated virus yields functionally diverse viral progeny. *Mol. Ther.* 2008;16(10):1703-1709. doi 10.1038/mt.2008.167
- Kohn D.B., Chen Y.Y., Spencer M.J. Successes and challenges in clinical gene therapy. *Gene Ther.* 2023;30(10-11):738-746. doi 10.1038/s41434-023-00390-5
- Kondakova O.B., Kazakova K.A., Lyalina A.A., Lapshina N.V., Pushkov A.A., Mazanova N.N., Davydova Yu.I., Grebenkin D.I., Kanivets I.V., Savostyanov K.V. Family case of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neuromuscul. Dis.* 2022;12(4):88-98. doi 10.17650/2222-8721-2022-12-4-88-98
- Kuroda H., Kutner R.H., Bazan N.G., Reiser J. A comparative analysis of constitutive and cell-specific promoters in the adult mouse hippocampus using lentivirus vector-mediated gene transfer. *J. Gene Med.* 2008;10(11):1163-1175. doi 10.1002/jgm.1249
- Lanshakov D.A., Drozd U.S., Dygalo N.N. Optogenetic stimulation increases level of antiapoptotic protein Bcl-xL in neurons. *Biochemistry (Mosc).* 2017a;82(3):340-344. doi 10.1134/S0006297917030129
- Lanshakov D.A., Drozd U.S., Zapara T.A., Dygalo N.N. Transfer of optogenetic vectors into the brain of neonatal animals to study neuron functions during subsequent periods of development. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017b;7(3):266-272. doi 10.1134/S2079059717030078
- Lanshakov D.A., Sukhareva E.V. Development of genetic engineering tools for p75^{ngfr} methylation and expression modulation. *J. Biosci. Med.* 2020;08(11):197-207. doi 10.4236/jbm.2020.811018
- Liguore W.A., Domire J.S., Button D., Wang Y., Dufour B.D., Srinivasan S., McBride J.L. AAV-PHP.B administration results in a differential pattern

- of CNS biodistribution in non-human primates compared with mice. *Mol. Ther.* 2019;27(11):2018-2037. doi 10.1016/j.yymthe.2019.07.017
- Maddalena A., Tornabene P., Tiberi P., Minopoli R., Manfredi A., Mutarelli M., Rossi S., Simonelli F., Naggert J.K., Cacchiarelli D., Auricchio A. Triple vectors expand AAV transfer capacity in the retina. *Mol. Ther.* 2018;26(2):524-541. doi 10.1016/j.yymthe.2017.11.019
- Mahlangu J., Kaczmarek R., Von Drygalski A., Shapiro S., Chou S.-C., Ozeilo M.C., Kenet G., Peyvandi F., Wang M., Madan B., Key N.S., Laffan M., Dunn A.L., Mason J., Quon D.V., Symington E., Leavitt A.D., Oldenburg J., Chambost H., Reding M.T., Jayaram K., Yu H., Mahajan R., Chavele K.-M., Reddy D.B., Henshaw J., Robinson T.M., Wong W.Y., Pipe S.W. Two-year outcomes of valoctocogene roxaparvovec therapy for hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2023;388(8):694-705. doi 10.1056/NEJMoa2211075
- Nakai H., Yant S.R., Storm T.A., Fuess S., Meuse L., Kay M.A. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J. Virol.* 2001;75(15):6969-6976. doi 10.1128/JVI.75.15.6969-6976.2001
- Nathwani A.C., Tuddenham E.G.D., Rangarajan S., Rosales C., McIntosh J., Linch D.C., Chowdhary P., Riddell A., Pie A.J., Harrington C., O'Beirne J., Smith K., Pasi J., Glader B., Rustagi P., Ng C.Y.C., Kay M.A., Zhou J., Spence Y., Morton C.L., Allay J., Coleman J., Sleep S., Cunningham J.M., Srivastava D., Basner-Tschakarjan E., Mingozzi F., High K.A., Gray J.T., Reiss U.M., Nienhuis A.W., Davidoff A.M. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2011;365(25):2357-2365. doi 10.1056/NEJMoa1108046
- Pham Q., Glicksman J., Chatterjee A. Chemical approaches to probe and engineer AAV vectors. *Nanoscale.* 2024;16(29):13820-13833. doi 10.1039/D4NR01300J
- Piedra-Quintero Z.L., Wilson Z., Nava P., Guerau-de-Arellano M. CD38: An immunomodulatory molecule in inflammation and autoimmunity. *Front. Immunol.* 2020;11:597959. doi 10.3389/fimmu.2020.597959
- Powell S.K., Rivera-Soto R., Gray S.J. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov. Med.* 2015;19(102):49-57
- Qin J.Y., Zhang L., Clift K.L., Hular I., Xiang A.P., Ren B.-Z., Lahn B.T. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One.* 2010;5(5):e10611. doi 10.1371/journal.pone.0010611
- Qiu J., Pintel D.J. Alternative polyadenylation of adeno-associated virus type 5 RNA within an internal intron is governed by the distance between the promoter and the intron and is inhibited by U1 small nuclear RNP binding to the intervening donor. *J. Biol. Chem.* 2004;279(15):14889-14898. doi 10.1074/jbc.M312734200
- Rabinowitz J.E., Rolling F., Li C., Conrath H., Xiao W., Xiao X., Samulski R.J. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* 2002;76(2):791-801. doi 10.1128/JVI.76.2.791-801.2002
- Rissiek B., Lukowiak M., Raczkowski F., Magnus T., Mittrücker H.-W., Koch-Nolte F. *In vivo* blockade of murine ARTC2.2 during cell preparation preserves the vitality and function of liver tissue-resident memory T cells. *Front. Immunol.* 2018;9:1580. doi 10.3389/fimmu.2018.01580
- Segura M.M., Kamen A., Garnier A. Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. *Biotechnol. Adv.* 2006;24(3):321-337. doi 10.1016/j.biotechadv.2005.12.001
- Shi W., Arnold G.S., Bartlett J.S. Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. *Hum. Gene Ther.* 2001;12(14):1697-1711. doi 10.1089/104303401750476212
- Shokoples B.G., Paradis P., Schiffrin E.L. P2X7 receptors: An untapped target for the management of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2021;41(1):186-199. doi 10.1161/ATVBAHA.120.315116
- Srivastava A. *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* 2016;21:75-80. doi 10.1016/j.coviro.2016.08.003
- Stemmer W.P.C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature.* 1994;370(6488):389-391. doi 10.1038/370389a0
- Talbot G.E., Waddington S.N., Bales O., Tchen R.C., Antoniou M.N. Desmin-regulated lentiviral vectors for skeletal muscle gene transfer. *Mol. Ther.* 2010;18(3):601-608. doi 10.1038/mt.2009.267
- Tervo D.G.R., Hwang B.-Y., Viswanathan S., Gaj T., Lavzin M., Ritola K.D., Lindo S., Michael S., Kuleshova E., Ojala D., Huang C.-C., Gerfen C.R., Schiller J., Dudman J.T., Hantman A.W., Looger L.L., Schaffer D.V., Karpova A.Y. A designer AAV variant permits efficient retrograde access to projection neurons. *Neuron.* 2016;92(2):372-382. doi 10.1016/j.neuron.2016.09.021
- Trapani I., Toriello E., De Simone S., Colella P., Iodice C., Polishchuk E.V., Sommella A., Colecchi L., Rossi S., Simonelli F., Giunti M., Bacci M.L., Polishchuk R.S., Auricchio A. Improved dual AAV vectors with reduced expression of truncated proteins are safe and effective in the retina of a mouse model of Stargardt disease. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24(23):6811-6825. doi 10.1093/hmg/ddv386
- Wang B., Li J., Fu F.H., Chen C., Zhu X., Zhou L., Jiang X., Xiao X. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther.* 2008;15(22):1489-1499. doi 10.1038/gt.2008.104
- Wang D., Tai P.W.L., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019;18(5):358-378. doi 10.1038/s41573-019-0012-9
- Wang H., Wang L., Zhong B., Dai Z. Protein splicing of inteins: A powerful tool in synthetic biology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022;10:810180. doi 10.3389/fbioe.2022.810180
- Wang J.-H., Gessler D.J., Zhan W., Gallagher T.L., Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2024;9(1):78. doi 10.1038/s41392-024-01780-w
- Xu R., Janson C., Mastakov M., Lawlor P., Young D., Mouravlev A., Fitzsimons H., Choi K.-L., Ma H., Dragunov M., Leone P., Chen Q., Dicker B., Doring M. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene Ther.* 2001;8(17):1323-1332. doi 10.1038/sj.gt.3301529
- Yan Z., Zhang Y., Duan D., Engelhardt J.F. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(12):6716-6721. doi 10.1073/pnas.97.12.6716
- Yan Z., Yan H., Ou H. Human thyroxine binding globulin (TBG) promoter directs efficient and sustaining transgene expression in liver-specific pattern. *Gene.* 2012;506(2):289-294. doi 10.1016/j.gene.2012.07.009
- Zhou X., Zeng X., Fan Z., Li C., McCown T., Samulski R.J., Xiao X. Adeno-associated virus of a single-polarity DNA genome is capable of transduction *in vivo*. *Mol. Ther.* 2008;16(3):494-499. doi 10.1038/sj.mt.6300397
- Zinn E., Pacouret S., Khaychuk V., Turunen H.T., Carvalho L.S., Andres-Mateos E., Shah S., Shelke R., Maurer A.C., Plovie E., Xiao R., Vandenberghe L.H. *In silico* reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. *Cell Rep.* 2015;12(6):1056-1068. doi 10.1016/j.celrep.2015.07.019

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.08.2024. После доработки 21.10.2024. Принята к публикации 24.10.2024.