

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ГЕНОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ

Н. Ю. Усман¹✉, Д. В. Ребриков^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Виральные механизмы доставки генетического материала широко используются в молекулярной медицине. Рекombинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV) представляют собой перспективный инструмент для доставки генов *in vivo*. В обзоре представлены нозологический спектр, молекулярные механизмы, выбор способа введения препарата в зависимости от структур-мишеней, выбор серотипа, а также методы производства активных ингредиентов для rAAV-опосредованной генной терапии.

Ключевые слова: аденоассоциированные вирусы, AAV, rAAV, генотерапия

Вклад авторов: Н. Ю. Усман — подготовка рукописи; Д. В. Ребриков — редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Юрьевна Усман
Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; natalia.usman@yandex.ru

Статья получена: 19.10.2021 **Статья принята к печати:** 29.10.2021 **Опубликована онлайн:** 31.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.051

RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUSES AS A GENE DELIVERY VEHICLE FOR THE USE IN MOLECULAR MEDICINE

Usman NYu¹✉, Rebrikov DV^{1,2}

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Viral mechanisms for the delivery of genetic material are widely used in molecular medicine. Recombinant adeno-associated viruses (rAAV) represent a promising tool for *in vivo* gene delivery. The review considers nosological spectrum, molecular mechanisms, the choice of drug administration route depending on target structures, the choice of serotype, and the methods of active ingredient manufacturing for rAAV-mediated gene therapy.

Keywords: adeno-associated viruses, AAV, rAAV, gene therapy

Author contribution: Usman NYu — preparation of the manuscript; Rebrikov DV — editing of the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia Usman
Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; natalia.usman@yandex.ru

Received: 19.10.2021 **Accepted:** 29.10.2021 **Published online:** 31.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.051

Биологические основы доставки генов, опосредованной рекомбинантными аденоассоциированными вирусами

Аденоассоциированные вирусы (adeno-associated viruses, AAV, род *Dependoparvovirus*, семейство Parvoviridae) были открыты как примесь в лабораторных препаратах аденовируса. Интерес к AAV, который долгое время был чисто научным, перешел в практическую плоскость в связи с развитием методов генной терапии.

Инфекционные частицы AAV имеют форму икосаэдра. Капсид образован тремя типами белковых субъединиц, варианты которых определяют серотип — специфичность вирусных частиц по отношению к иммунной системе реципиента. В капсид упакована одна копия одноцепочечной геномной ДНК размером около 4700 нуклеотидов, которая может быть смысловой или антисмысловой. Характерной особенностью генома AAV являются инвертированные концевые повторы (inverted terminal repeats, ITR) с Т-образной вторичной структурой, которые затравляют синтез комплементарной цепи ДНК в ядре инфицированной клетки. Помимо этого, ITR функционируют как рекомбиногенные последовательности для образования транскрибируемых конкатемерных молекул ДНК, а также служат ориджином репликации и

сигналом упаковки. Геном AAV содержит два кодирующих гена *rep* и *cap* с несколькими рамками считывания: *rep* — для факторов репликации и сборки частиц, *cap* — для белков капсида. Важно подчеркнуть, что жизненный цикл AAV может поддерживаться только при коинфекции клетки-хозяина другими вирусами.

Виральные механизмы доставки генетического материала широко используются в молекулярной медицине. Для их реализации геном вируса дикого типа (прототип) распределяют по разным несущим (векторным) молекулам ДНК. Структурирующие и регуляторные элементы вируса клонируют в один вектор, в сочетании с терапевтическим модулем (карго) для получения составной (рекомбинантной) единицы, предназначенной для доставки в клетки реципиента. Кодирующие последовательности собственных генов вируса клонируют в другой вектор. Использование векторизованных фрагментов ДНК, которые функционально дополняют друг друга, но разобщены физически, называется *транс-комплементация*. Данный подход решает сразу две проблемы: 1) при удалении собственных кодирующих последовательностей вируса внутри капсида освобождается место для карго; 2) рекомбинантный вирус не опасен для клетки-мишени благодаря отсутствию определенных генов, необходимых для поддержания

его жизненного цикла. Производство вирусных частиц происходит в живой клетке. Получив оба вектора, эта клетка начинает продуцировать инфекционные частицы, содержащие рекомбинантную вирусную ДНК.

Рекомбинантные AAV (recombinant AAV, rAAV) являются перспективной платформой для генной терапии *in vivo*. По сравнению с альтернативными системами, rAAV обладают рядом преимуществ:

1) среди известных штаммов AAV нет ни одного патогенного для человека, поэтому спорадический возврат вируса к дикому типу не представляет угрозы для здоровья пациента;

2) нуклеотидная последовательность rAAV не встраивается в геном клетки-мишени, что является важнейшим фактором безопасности (AAV дикого типа способны к интеграции в геномный локус AAVS1, что переводит вирус в латентное состояние. Процесс интеграции основан на сходстве последовательностей ITR и AAVS1, и происходит при участии вирусных белков Rep. Рекомбинантные AAV не содержат кодирующих последовательностей *rep* и в геном человека не интегрируются);

3) мелкие инфекционные частицы AAV (20–26 нм) лучше проникают в ткани по сравнению с ретро- и лентивирусами (100–200 нм), некоторые серотипы AAV проходят через гематоэнцефалический барьер.

К недостаткам rAAV платформ относятся дорогое сложное производство, необходимость использования генетической информации других вирусов (адено-, герпес симплекс или бакуло-) как потенциального источника биологической контаминации, а также риск избыточного иммунного ответа на препарат и жесткое ограничение по размеру карго [1–3].

Нозологический спектр применения rAAV-опосредованной генной терапии

Среди показаний к применению генной терапии с rAAV-опосредованной доставкой исторически преобладают моногенные аутосомно-рецессивные заболевания [2]. В то же время возможность применения rAAV активно исследуется для многих заболеваний с комплексной этиологией, включающей в себя не только генетические, но и средовые факторы: сердечная недостаточность [4, 5], хронические воспаления суставов [6], неврологические и нейродегенеративные заболевания [7–9], злокачественные опухоли [10, 11], тяжелые вирусные инфекции [12].

Терапевтические задачи rAAV-опосредованной доставки генов

Под терапевтической задачей доставки нуклеиновых кислот в клетки пациента подразумевается молекулярный механизм компенсаторного эффекта. Для моногенных заболеваний по умолчанию рассматривается функциональное замещение мутантных аллелей полноценными транскрипционными единицами (gene replacement). Альтернативами замещению могут быть коррекция сигнальных путей за счет добавления активных копий генов (gene addition), специфическое выключение генов-мишеней продуктами экспрессии трансгена на уровне транскрипции, трансляции или белка (gene silencing), а также доставка ДНК-матриц для геномного редактирования, например, CRISPR/Cas (gene editing) [2].

Выбор способа введения препарата в зависимости от целевых структур

Местное введение rAAV подходит для лечения патологических процессов, локализованных в анатомических структурах с облегченным доступом (глазное яблоко, сустав). При патологиях центральной нервной системы (ЦНС) препарат может быть инъецирован в определенную область мозга или ликвор, однако обе процедуры являются высоко инвазивными. Малоинвазивное системное введение rAAV работает далеко не во всех клинических ситуациях.

При местном введении выбор серотипа rAAV играет второстепенную роль. При системном введении успех терапии, напротив, зависит от выбора серотипа для максимально избирательной трансдукции (таргетирования) целевых органов и тканей. Среди других органов наиболее результативно таргетируются печень и мышцы.

Для таргетирования печени подходит практически любой серотип AAV. Это согласуется с тем, что большинство естественных инфекций AAV у человека и приматов локализовано в печени и селезенке. Гепатоциты служат основной мишенью генотерапевтической коррекции при различных моногенных нарушениях метаболизма, в числе которых наследственная гиперхолестеринемия (*LDLR*), дефицит орнитинтранскарбамилазы (*OTC*), синдром Криглера–Найяра (*UGT1A1*), гемофилия А (*F8*), гемофилия В (*F9*), болезнь накопления гликогена I типа (*G6PC*), мукополисахаридоз I, II, IIIA, VI типа (соответственно, *IDUA*, *IDS*, *SGSH* или *ARSB*) и др.

Для таргетирования мышц подходят серотипы AAV8 и AAV9. К заболеваниям, при которых первичной мишенью является мышечная ткань, относятся болезнь Дюшенна (*DMD*), болезнь Помпе (*GAA*), X-сцепленная миотубулярная миопатия (*MTM1*). Важно отметить, что в случае успешной трансдукции мышечная ткань может служить фабрикой секретируемых полипептидов для лечения немускульных заболеваний.

Трансдукция нейронов и глиальных клеток ЦНС требует применения высокоинвазивных методик введения либо использования серотипов, способных пересекать гематоэнцефалический барьер (например, AAV9 или AAVrh.10). К моногенным патологиям ЦНС, для которых рассматривается использование rAAV-платформ, относятся спинальная мышечную атрофию (*SMN1*), дефицит декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (*DDC*), болезнь Канавана (*ASPA*), GM1 ганглиозидоз (*GLB1*), мукополисахаридоз III типа (*GNS*, *HGSNAT*, *NAGLU*, *SGSH*), синдром Ретта (*MECP2*), болезнь Баттена (*CLN2*, *CLN6*) [2].

Выбор серотипа

Разработка серотипов rAAV образует целое направление научно-прикладных исследований, в котором были достигнуты значительные успехи. На системном уровне серотип должен обеспечивать эффективное таргетирование препарата при минимальной иммуногенности (иммунный ответ может быть направлен на продукт экспрессии трансгена, если он чужеродный). На субклеточном уровне серотип должен обеспечивать сохранность частиц во время эндосомного транспорта и устойчивость частиц к протеасомной деградации в цитозоле перед транспортировкой в ядро, где вирусная ДНК выходит из капсида. Дизайн серотипов основан на изменении структуры белков капсида AAV, кодируемых

геном *cap*. Современные подходы, используемые для получения капсидов с улучшенными свойствами, включают в себя направленную эволюцию, рациональный дизайн и заимствование у природы.

Под направленной эволюцией подразумевают искусственный отбор успешных вариантов после внесения случайных изменений в нуклеотидную последовательность гена *cap* при помощи полимеразной цепной реакции с низкой точностью копирования (error-prone PCR) или множественного обмена фрагментами между различными вариантами кодирующей последовательности (capsid shuffling). Рациональный дизайн — это целенаправленная оптимизация серотипа методами белковой инженерии. Изменения в структуру полипептидов вносятся на уровне кодирующих нуклеотидных последовательностей. Сайт-направленный мутагенез (site-directed mutagenesis) позволяет вносить единичные замены по антигенно-значимым аминокислотным положениям в полипептиде. Так, замены тирозиновых остатков, выходящих на поверхность частиц, могут значительно повышать эффективность эндосомного транспорта после интернализации частиц и их устойчивость к протеасомной деградации в цитозоле; соответствующее усиление эффективности трансдукции было продемонстрировано на мышиной модели [13]. Модификация эпитопов в уже собранном капсиде возможна химическими методами [14]. Еще одним направлением рационального дизайна капсидов для rAAV является создание химерных генов на основе *cap*. Примерами модификаций, направленных на усиление специфичности связывания частиц с клеточной поверхностью, служат добавление интегрин-связывающих мотивов или иммуноглобулиноподобных доменов ScFv со специфичностью к поверхностным маркерам клеточ-мишеней [2].

Наконец, новые полезные с точки зрения медицинского применения серотипы AAV могут быть обнаружены путем анализа данных, полученных с помощью высокопроизводительных методов определения структуры биополимеров. Грамотное заимствование у природы предполагает всестороннее изучение доступных вариантов. Большинство штаммов AAV видоспецифичны: одни живут в организме человека, другие — в организме мыши и т. д. Распространенность антител к AAV в человеческих популяциях достигает 80% [15]. Если мы «оденем» терапевтический конструктор в капсид одного из штаммов AAV, обнаруживаемых у человека, то с высокой вероятностью иммунная система пациента быстро атакует препарат, титр снизится, и трансдукция окажется неэффективной. С другой стороны, если мы выберем серотип, сильно отличающийся от человеческих штаммов (например, мышиный), то рискуем получить избыточный иммунный ответ с самыми тяжелыми последствиями. Кроме того, сродство частиц к рецепторам на поверхности клетки может оказаться недостаточно сильным, поскольку мышиные серотипы AAV заточены эволюцией под мышиные же рецепторы, и трансдукция снова окажется неэффективной. Проблема имеет два решения.

1. При заимствовании серотипов у близкородственных видов (приматов) вероятность избыточных иммунных реакций умеренная. У пациента, скорее всего, соответствующие высокоаффинные антитела будут отсутствовать, в то время как рецепторы на поверхности клеток-мишеней будут удовлетворительно распознавать такие частицы. Серотипы приматов активно исследуются для медицинского применения; так, в обозначении

серотипа AAVrh.10, уже зарекомендовавшего себя в клинических исследованиях, *rh* отображает название таксона (*rhesus monkey*, *Macaca mulatta*).

2. Можно использовать серотипы, некогда присутствовавшие в вирусе человека, но уже упрямленные эволюцией. Такие предковые серотипы (ancestral serotypes), к которым у пациента нет антител, находят методами вычислительной эволюционной генетики *in silico*.

С практической точки зрения, важно понимать, что дизайн серотипов является самостоятельной масштабной задачей, решение которой требует исчерпывающего функционального тестирования. Генерировать варианты достаточно просто; оценивать результат методически очень сложно. На сегодня в клинической практике, включая испытания, фигурирует всего лишь около десятка различных серотипов rAAV, наиболее распространенным из которых является AAV2. Тем не менее, в это число входит несколько относительно новых серотипов с продвинутыми возможностями таргетирования, прежде всего, AAV8, AAV9 и AAVrh.10 [2].

Конструирование терапевтических модулей

Создание генетических конструкций для rAAV-опосредованной доставки имеет ряд особенностей. От нуклеотидных последовательностей самого вируса в конструкции оставлены только ITR, остальное пространство отведено под терапевтический модуль. Минимальная кассета состоит из промотора, кодирующей последовательности и 3'-некодирующей области с сигналами полиаденилирования и терминации транскрипции. Предельный размер содержимого частиц (packaging size limit) составляет 4700 нуклеотидов, включая ITR. Экспериментальная попытка упаковки конструкции размером свыше 5200 нуклеотидов привела к упаковке фрагментов переменной длины с транскрипционной (обрубленной) 5'-концевой областью. Такие дефектные частицы были способны обеспечивать доставку репортерных генов *in vitro* лишь при высокой множественности заражения, что совершенно не приемлемо для клинического применения *in vivo* [3]. Принципы и проблематика инженерии терапевтических модулей для rAAV представлены в таблице.

Методы производства rAAV

Производство рекомбинантных вирусов основано на использовании перевиваемых культур эукариотических клеток в качестве пакировщиков. Удобнее всего использовать специализированные клеточные линии, генетически модифицированные под данную задачу: в их собственные хромосомы встроены некоторые (но не все) гены, обслуживающие продукцию инфекционных частиц (packaging cell lines).

Первыми пакировщиками частиц rAAV были клетки HeLa, стабильно трансфицированные (stably transfected, то есть со встроенными в хромосомы) копиями генов *rep-cap* и собственно генома rAAV (терапевтический модуль, фланкированный ITR). Нарботка частиц rAAV в такой системе стартует при заражении клеток аденовирусом (AdV). У системы есть серьезные минусы, прежде всего, присутствие AdV в качестве биологического контаминанта (adventitious agent); AdV может быть инактивирован прогревом образцов при 56 °C в течение 30–60 мин, к которому rAAV устойчив. Еще один минус данной системы заключался в том, что для

Таблица. Дизайн нуклеотидных последовательностей для rAAV-опосредованной генной терапии

Основные требования	Проблемы	Варианты решений	Примеры и пояснения
Терапевтический эффект должен быть максимальным	Уровень экспрессии трансгена может быть недостаточно высоким	Использовать сильные промоторы	Промотор цитомегаловируса (CMV)
		Использовать дополнительные регуляторные элементы, усиливающие экспрессию	Интроны-энхансеры, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, WPRE)
		Добавить консенсус Козак (Kozak)	CCACCATG или CCACCATGG, где ATG — стартовый кодон
		Оптимизировать использование кодонов и GC состав	
	Элиминировать мотивы-ингибиторы	Криптические сайты сплайсинга и терминаторы, а также вторичные структуры, снижающие стабильность транскрипта	
	Супра-физиологические уровни экспрессии трансгена в целевых и нецелевых тканях могут быть токсичны		Эффект описан для трансгенов <i>MECP2</i> (гепатотоксичность в экспериментальной модели синдрома Ретта на мышах [16]) и гексозаминидазы (трансген <i>HexA/HexB</i> , нейротоксичность в экспериментальной модели GM2 ганглиозидоза на приматах [17])
Экспрессия трансгена должна быть специфичной	Экспрессия трансгена в нецелевых структурах может существенно усилить иммунный ответ на продукт	Использовать тканеспецифичные промоторы	
		Добавить сайты связывания для микроРНК, высоко представленных в антиген-презентирующих клетках, в 3'-некодирующую область трансгена	Профессиональные антиген-презентирующие клетки экспрессируют микро РНК miR-142-3p. Добавление сайтов связывания miR-142-3p снижает экспрессию трансгена в макрофагах и дендритных клетках, что ослабляет иммунный ответ на продукт [18]
Аккомодация крупных трансгенов	Кодирующие последовательности генов бывают очень длинными	Экономить место, создавая мини- и микрогены, кодирующие неполные полипептиды с (частично) сохранной функцией	Клинический потенциал данного подхода исследуется для болезни Дюшенна (<i>DMD</i>), <i>CEP290</i> -ассоциированной формы врожденного амавроза Лебера и дисферлинопатии (<i>DYSA</i>) [2]
		Доставлять кодирующую последовательность по частям	Стратегия инженерии следующая: разделить открытую рамку считывания по границе между белковыми доменами, клонировать фрагменты в два разных вектора для упаковки в отдельные вирусные частицы, в каждый конструктор добавить рекомбиногенные последовательности, фланкированные сайтами сплайсинга для удаления из пре-мРНК. В качестве альтернативы предложено использовать посттрансляционное воссоединение по механизму интеин-опосредованного белкового <i>транс</i> -сплайсинга; выполнимость доказана для некоторых клинически значимых полипептидов (дистрофин, Cas9). Учитывая низкую эффективность восстановления целостности полипептидов в экспериментальных системах, о клинических применениях таких подходов пока говорить рано. Поскольку успех зависит от вероятности одновременного заражения одной и той же клетки-мишени двумя разными типами частиц, может потребоваться увеличение вирусной нагрузки по сравнению со стандартами [2, 19]
Обеспечение длительного присутствия трансгена в клетках-мишенях	Присутствие трансгена в виде нереплицируемых конкатемерных молекул (эписом), которые в митотически активных клеточных популяциях неизбежно разбавляются	Стимулировать интеграцию с учетом рисков генотоксичности	Использование rAAV является методом выбора для доставки генов <i>in vivo</i> в силу своей безопасности по сравнению с использованием ретро- и лентивирусных векторов, которые встраиваются в геном клетки-хозяина при трансдукции. Крайне редкие случаи спонтанной частичной интеграции материала rAAV в геном человека не имеют клинического значения [20]. Сайт-специфичная интеграция трансгена rAAV может быть осуществлена методами геномного редактирования, однако данный тип вмешательства сопряжен с повышенным риском генотоксичности. Нежелательные побочные эффекты в отношении хромосомного окружения по месту интеграции трансгена могут быть уменьшены за счет добавления элементов-инсуляторов [21]

каждого нового сочетания конструктор-серотип приходилось получать новую линию генетически модифицированных клеток HeLa [22]. В следующем поколении клеточных систем для производства rAAV в качестве хелпера использовался репликационно-дефектный герпес симплекс вирус (replication-deficient HSV) [23].

Наиболее распространенные современные протоколы производства rAAV основаны на использовании клеточной линии HEK293 с двумя встроенными генами AdV — *E1a* и *E1b*. Несколько других необходимых генов AdV встроены в плазмиду-хелпер (helper plasmid) и подаются в систему только в начале производственного цикла. Разделение генов AdV по разным носителям продиктовано соображениями безопасности: длительное пребывание значительной части генетического материала AdV в одной клетке может привести к рекомбинации с восстановлением репликационно-компетентного AdV, контагиозного и потенциально опасного для человека. На другой плазмиде, обозначаемой как *цис*-плаزمид (*cis*-plasmid), находится матрица для репликации — терапевтический модуль, фланкированный ITR. Еще один молекулярный носитель, так называемая *транс*-плаزمид (*trans*-plasmid), содержит гены *гер* и *сар*. Это собственные гены AAV, экспрессия которых необходима для репликации геномной ДНК rAAV и упаковки вирусных частиц. Все три плазмиды (хелпер, *цис*- и *транс*-) являются продуктами геновой инженерии; их нуклеотидные последовательности тщательно выверены. Плазмиды нарабатывают в бактериях *E. coli* в количествах, необходимых для трансфекции.

Трансфекция является наиболее щадящим невирусным методом доставки генетического материала в эукариотические клетки. При трансфекции генетический материал попадает в клетку посредством фагоцитоза (в отличие от трансдукции, подразумевающей использование вирусных механизмов доставки). Для трансфекции ДНК включают в состав коллоидных частиц какого-нибудь подходящего физиологически нейтрального вещества (фосфат кальция, липофектамин, полиэтиленмин), и эти частицы «скармливают» клеткам. Большинство протоколов трансфекции использует одну и ту же схему: плазмидную ДНК разводят небольшим объемом бессывороточной среды или физраствора, так же разводят наполнитель, объединяют, инкубируют для образования фагоцитируемых комплексов и добавляют к клеткам. Важно отметить, что клеточная линия HEK293^{E1ab} была адаптирована для суспензионного роста в большом объеме с целью повышения выходов рекомбинантного вируса [2, 24].

В процессе репликации rAAV в живых клетках может происходить захват фрагментов генетического материала самих клеток. Учитывая, что и HeLa, и HEK293 — это производные клеток человека, такой захват нельзя считать абсолютно безопасным. Контаминация терапевтических конструкций клеточными последовательностями может способствовать их интеграции в геном пациента, тем самым обуславливая генотоксические эффекты. В обход данной проблемы было предложено использовать клетки насекомых Sf9 в сочетании с совместимыми хелперными последовательностями бакуловирусов; идея оказалась перспективной [25].

Вне зависимости от конкретного протокола производства rAAV, по завершении процесса нужно собрать не только культуральную среду (супернатант),

но и сами клетки, внутри которых остается значительное количество частиц (тогда как при производстве ретро- и лентивирусов, как правило, достаточно собрать супернатант). В лизатах присутствует огромное количество свободной ДНК (вирусной и невирусной), поэтому в протокол очистки вводится обязательный этап обработки ДНКазой. В первичных изолятах rAAV всегда есть значительная примесь пустых и недоукомплектованных частиц, от которых избавляются центрифугированием в градиенте плотности CsCl или йодиксанола, за которым следует несколько этапов хроматографической очистки. Для исследовательских задач возможна очистка частиц ультрацентрифугированием, которая не может быть масштабирована для производства [26].

Заключение

Мировой опыт клинического применения rAAV быстро расширяется, и интерес к исследованиям в данной области остается очень высоким. Первым лекарством на основе rAAV, полностью одобренным для клинического применения, стала Glybera® (*a.k.a.* Alipogene tiparvovec, uniQure; Нидерланды), обеспечивающая компенсацию аутосомно-рецессивного дефицита липопротеинлипазы (LPL). Данный фермент вырабатывается в жировой ткани и мышцах человека, секретируется в кровь и работает на внутренней поверхности эндотелия капилляров в экстрапеченочных тканях. Пациенты с дефицитом LPL испытывают тяжелые нарушения метаболизма триглицеридов. Активным действующим веществом Glybera® являются вирусные частицы с серотипом AAV1, содержащие копию гена LPL с усиливающими экспрессию регуляторными элементами. Glybera® вводится внутримышечно многократным обкалыванием один раз в 10 лет. Препарат был разрешен для использования в Европе в 2012 г., однако уже в 2017 г. исключен из Реестра орфанных лекарственных средств ЕС ввиду коммерческого провала; по состоянию на 2018 г., лечение получил 31 пациент [27, 28].

Другой препарат на основе rAAV, Luxturna® (*a.k.a.* Voretigene neparvovec, Spark Therapeutics; США), получил известность как первая генная терапия на основе rAAV, одобренная Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (the U.S. Food and Drug Administration agency, FDA). Luxturna®, одобренная FDA в 2017 г., применяется при RPE65-зависимой форме врожденного амавроза Лебера — тяжелой аутосомно-рецессивной окулопатии, проявляющейся начиная с рождения. Активным действующим веществом Luxturna® являются инфекционные частицы с серотипом AAV2, содержащие кодирующую последовательность гена RPE65 с усиливающими экспрессию регуляторными элементами. Препарат вводят посредством субретинальной инъекции [29].

В 2019 г. одобрение FDA получило еще одно лекарство на основе rAAV, Zolgensma®, предназначенное для лечения аутосомно-рецессивной спинальной мышечной атрофии [30]. Запрос «adeno-associated virus» на сайте ClinicalTrials.gov выдает список из 159 зарегистрированных исследований [31]. Клинические испытания продолжаются; поскольку в области применения rAAV пока больше вопросов, чем ответов, можно ожидать, что число их будет расти.

Литература

- Chen W, Yao S, Wan J, Tian Y, Huang L, Wang S, et al. BBB-crossing adeno-associated virus vector: An excellent gene delivery tool for CNS disease treatment. *J Control Release*. 2021; 333: 129–38. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.03.029. PubMed PMID: 33775685.
- Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18 (5): 358–78. DOI: 10.1038/s41573-019-0012-9. PubMed PMID: 30710128.
- Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther*. 2010; 18 (1): 80–6. DOI: 10.1038/mt.2009.255. Epub 2009 Nov 10. PubMed PMID: 19904234.
- Bass-Stringer S, Bernardo BC, May CN, Thomas CJ, Weeks KL, McMullen JR. Adeno-Associated Virus Gene Therapy: Translational Progress and Future Prospects in the Treatment of Heart Failure. *Heart Lung Circ*. 2018; 27 (11): 1285–300. DOI: 10.1016/j.hlc.2018.03.005. PubMed PMID: 29703647.
- Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, Barnard D, Bouchard A, Jaski B, Lyon AR, Pogoda JM, Rudy JJ, Zsebo KM. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet*. 2016; 387 (10024): 1178–86. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00082-9. PubMed PMID: 26803443.
- Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection. *Hum Gene Ther*. 2018; 29 (1): 2–14. DOI: 10.1089/hum.2017.181. PubMed PMID: 29160173.
- Huang L, Wan J, Wu Y, Tian Y, Yao Y, Yao S, et al. Challenges in adeno-associated virus-based treatment of central nervous system diseases through systemic injection. *Life Sci*. 2021; 270: 119142. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119142. PubMed PMID: 33524419.
- Mijanović O, Branković A, Borovjagin A, Butnaru DV, Bezrukov EA, Sukhanov RB, Shpichka A, Timashev P, Ulasov I. Battling Neurodegenerative Diseases with Adeno-Associated Virus-Based Approaches. *Viruses*. 2020; 12 (4): 460. DOI: 10.3390/v12040460. PubMed PMID: 32325732.
- Privolizzi R, Chu WS, Tijani M, Ng J. Viral gene therapy for paediatric neurological diseases: progress to clinical reality. *Dev Med Child Neurol*. 2021; 63 (9): 1019–29. DOI: 10.1111/dmcn.14885. PubMed PMID: 33834479.
- Nawaz W, Huang B, Xu S, Li Y, Zhu L, Yiqiao H, et al. AAV-mediated in vivo CAR gene therapy for targeting human T-cell leukemia. *Blood Cancer J*. 2021; 11 (6): 119. DOI: 10.1038/s41408-021-00508-1. PubMed PMID: 34162832.
- Bower JJ, Song L, Bastola P, Hirsch ML. Harnessing the Natural Biology of Adeno-Associated Virus to Enhance the Efficacy of Cancer Gene Therapy. *Viruses*. 2021; 13 (7): 1205. DOI: 10.3390/v13071205. PubMed PMID: 34201599.
- Colón-Thillet R, Jerome KR, Stone D. Optimization of AAV vectors to target persistent viral reservoirs. *Viral J*. 2021; 18 (1): 85. DOI: 10.1186/s12985-021-01555-7. PubMed PMID: 33892762.
- Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Cooper M, et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (22): 7827–32. DOI: 10.1073/pnas.0802866105. PubMed PMID: 18511559.
- Kelemen RE, Mukherjee R, Cao X, Erickson SB, Zheng Y, Chatterjee A. A Precise Chemical Strategy To Alter the Receptor Specificity of the Adeno-Associated Virus. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016; 55 (36): 10645–9. DOI: 10.1002/anie.201604067. PubMed PMID: 27483453.
- Calcedo R, Morizono H, Wang L, McCarter R, He J, Jones D, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18 (9): 1586–8. DOI: 10.1128/CVI.05107-11. PubMed PMID: 21775517.
- Gadalla KKE, Vudhironarit T, Hector RD, Sinnett S, Bahey NG, Bailey MES, et al. Development of a Novel AAV Gene Therapy Cassette with Improved Safety Features and Efficacy in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017; 5: 180–90. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.04.007. PubMed PMID: 28497075.
- Golebiowski D, van der Bom IMJ, Kwon CS, Miller AD, Petrosky K, Bradbury AM, et al. Direct Intracranial Injection of AAVrh8 Encoding Monkey β -N-Acetylhexosaminidase Causes Neurotoxicity in the Primate Brain. *Hum Gene Ther*. 2017; 28 (6): 510–22. DOI: 10.1089/hum.2016.109. PubMed PMID: 28132521.
- Majowicz A, Maczuga P, Kwikkers KL, van der Marel S, van Logtenstein R, Petry H, et al. Mir-142-3p target sequences reduce transgene-directed immunogenicity following intramuscular adeno-associated virus 1 vector-mediated gene delivery. *J Gene Med*. 2013; 15 (6–7): 219–32. DOI: 10.1002/jgm.2712. PubMed PMID: 23658149.
- Chamberlain K, Riyad JM, Weber T. Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Hum Gene Ther Methods*. 2016; 27 (1): 1–12. DOI: 10.1089/hgtb.2015.140. PubMed PMID: 26757051.
- Kaeppl C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, Salmon F, Schmidt S, et al. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med*. 2013; 19 (7): 889–91. DOI: 10.1038/nm.3230. PubMed PMID: 23770691.
- Liu M, Maurano MT, Wang H, Qi H, Song CZ, Navas PA, et al. Genomic discovery of potent chromatin insulators for human gene therapy. *Nat Biotechnol*. 2015; 33 (2): 198–203. DOI: 10.1038/nbt.3062. PubMed PMID: 25580597.
- Clark KR, Voulgaropoulou F, Fraley DM, Johnson PR. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*. 1995; 6 (10): 1329–41. DOI: 10.1089/hum.1995.6.10-1329. PubMed PMID: 8590738.
- Clément N, Knop DR, Byrne BJ. Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies. *Hum Gene Ther*. 2009; 20 (8): 796–806. DOI: 10.1089/hum.2009.094. PubMed PMID: 19569968.
- Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol Ther*. 2016; 24 (2): 287–97. DOI: 10.1038/mt.2015.187. PubMed PMID: 26437810.
- Kondratov O, Marsic D, Crosson SM, Mendez-Gomez HR, Moskalenko O, Mietzsch M, et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells. *Mol Ther*. 2017; 25 (12): 2661–75. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003. PubMed PMID: 28890324.
- Nass SA, Mattingly MA, Woodcock DA, Burnham BL, Ardingier JA, Osmond SE, et al. Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017; 9: 33–46. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.12.004. PubMed PMID: 29349097.
- Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Alipogene_tiparovvec.
- Balasubramanian S, Aggarwal P, Sharma S. Lipoprotein Lipase Deficiency. In: *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021*. PubMed PMID: 32809630.
- Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Voretigene_neparovvec.
- Available from: <https://www.askbio.com/newly-approved-spinal-muscular-atrophy-gene-therapy-zolgensma-validates-askbio-gene-therapy-platform/>.
- Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=adeno-associated+virus&cntry=&state=&city=&dist=> retrieved on 2021-10-26.

References

- Chen W, Yao S, Wan J, Tian Y, Huang L, Wang S, et al. BBB-crossing adeno-associated virus vector: An excellent gene delivery tool for CNS disease treatment. *J Control Release*. 2021; 333: 129–38. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.03.029. PubMed PMID: 33775685.
- Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18 (5): 358–78. DOI: 10.1038/s41573-019-0012-9. PubMed PMID: 30710128.
- Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther*. 2010; 18 (1): 80–6. DOI: 10.1038/mt.2009.255. Epub 2009 Nov 10. PubMed PMID: 19904234.
- Bass-Stringer S, Bernardo BC, May CN, Thomas CJ, Weeks KL, McMullen JR. Adeno-Associated Virus Gene Therapy: Translational Progress and Future Prospects in the Treatment of Heart Failure. *Heart Lung Circ*. 2018; 27 (11): 1285–300. DOI: 10.1016/j.hlc.2018.03.005. PubMed PMID: 29703647.
- Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, Barnard D, Bouchard A, Jaski B, Lyon AR, Pogoda JM, Rudy JJ, Zsebo KM. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet*. 2016; 387 (10024): 1178–86. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00082-9. PubMed PMID: 26803443.
- Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection. *Hum Gene Ther*. 2018; 29 (1): 2–14. DOI: 10.1089/hum.2017.181. PubMed PMID: 29160173.
- Huang L, Wan J, Wu Y, Tian Y, Yao Y, Yao S, et al. Challenges in adeno-associated virus-based treatment of central nervous system diseases through systemic injection. *Life Sci*. 2021; 270: 119142. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119142. PubMed PMID: 33524419.
- Mijanović O, Branković A, Borovjagin A, Butnaru DV, Bezrukov EA, Sukhanov RB, Shpichka A, Timashev P, Ulasov I. Battling Neurodegenerative Diseases with Adeno-Associated Virus-Based Approaches. *Viruses*. 2020; 12 (4): 460. DOI: 10.3390/v12040460. PubMed PMID: 32325732.
- Privolizzi R, Chu WS, Tijani M, Ng J. Viral gene therapy for paediatric neurological diseases: progress to clinical reality. *Dev Med Child Neurol*. 2021; 63 (9): 1019–29. DOI: 10.1111/dmcn.14885. PubMed PMID: 33834479.
- Nawaz W, Huang B, Xu S, Li Y, Zhu L, Yiqiao H, et al. AAV-mediated in vivo CAR gene therapy for targeting human T-cell leukemia. *Blood Cancer J*. 2021; 11 (6): 119. DOI: 10.1038/s41408-021-00508-1. PubMed PMID: 34162832.
- Bower JJ, Song L, Bastola P, Hirsch ML. Harnessing the Natural Biology of Adeno-Associated Virus to Enhance the Efficacy of Cancer Gene Therapy. *Viruses*. 2021; 13 (7): 1205. DOI: 10.3390/v13071205. PubMed PMID: 34201599.
- Colón-Thillet R, Jerome KR, Stone D. Optimization of AAV vectors to target persistent viral reservoirs. *Virol J*. 2021; 18 (1): 85. DOI: 10.1186/s12985-021-01555-7. PubMed PMID: 33892762.
- Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Cooper M, et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (22): 7827–32. DOI: 10.1073/pnas.0802866105. PubMed PMID: 18511559.
- Kelemen RE, Mukherjee R, Cao X, Erickson SB, Zheng Y, Chatterjee A. A Precise Chemical Strategy To Alter the Receptor Specificity of the Adeno-Associated Virus. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016; 55 (36): 10645–9. DOI: 10.1002/anie.201604067. PubMed PMID: 27483453.
- Calcedo R, Morizono H, Wang L, McCarter R, He J, Jones D, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18 (9): 1586–8. DOI: 10.1128/CVI.05107-11. PubMed PMID: 21775517.
- Gadalla KKE, Vudhironarit T, Hector RD, Sinnett S, Bahey NG, Bailey MES, et al. Development of a Novel AAV Gene Therapy Cassette with Improved Safety Features and Efficacy in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017; 5: 180–90. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.04.007. PubMed PMID: 28497075.
- Golebiowski D, van der Bom IMJ, Kwon CS, Miller AD, Petrosky K, Bradbury AM, et al. Direct Intracranial Injection of AAVrh8 Encoding Monkey β -N-Acetylhexosaminidase Causes Neurotoxicity in the Primate Brain. *Hum Gene Ther*. 2017; 28 (6): 510–22. DOI: 10.1089/hum.2016.109. PubMed PMID: 28132521.
- Majowicz A, Maczuga P, Kwikkers KL, van der Marel S, van Logtenstein R, Petry H, et al. Mir-142-3p target sequences reduce transgene-directed immunogenicity following intramuscular adeno-associated virus 1 vector-mediated gene delivery. *J Gene Med*. 2013; 15 (6–7): 219–32. DOI: 10.1002/jgm.2712. PubMed PMID: 23658149.
- Chamberlain K, Riyad JM, Weber T. Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Hum Gene Ther Methods*. 2016; 27 (1): 1–12. DOI: 10.1089/hgtb.2015.140. PubMed PMID: 26757051.
- Kaepfel C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, Salmon F, Schmidt S, et al. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med*. 2013; 19 (7): 889–91. DOI: 10.1038/nm.3230. PubMed PMID: 23770691.
- Liu M, Maurano MT, Wang H, Qi H, Song CZ, Navas PA, et al. Genomic discovery of potent chromatin insulators for human gene therapy. *Nat Biotechnol*. 2015; 33 (2): 198–203. DOI: 10.1038/nbt.3062. PubMed PMID: 25580597.
- Clark KR, Voulgaropoulou F, Fraley DM, Johnson PR. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*. 1995; 6 (10): 1329–41. DOI: 10.1089/hum.1995.6.10-1329. PubMed PMID: 8590738.
- Clément N, Knop DR, Byrne BJ. Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies. *Hum Gene Ther*. 2009; 20 (8): 796–806. DOI: 10.1089/hum.2009.094. PubMed PMID: 19569968.
- Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol Ther*. 2016; 24 (2): 287–97. DOI: 10.1038/mt.2015.187. PubMed PMID: 26437810.
- Kondratov O, Marsic D, Crosson SM, Mendez-Gomez HR, Moskalenko O, Mietzsch M, et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells. *Mol Ther*. 2017; 25 (12): 2661–75. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003. PubMed PMID: 28890324.
- Nass SA, Mattingly MA, Woodcock DA, Burnham BL, Ardinger JA, Osmond SE, et al. Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017; 9: 33–46. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.12.004. PubMed PMID: 29349097.
- Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Alipogene_tiparovec.
- Balasubramanian S, Aggarwal P, Sharma S. Lipoprotein Lipase Deficiency. In: *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. PubMed PMID: 32809630*.
- Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Voretigene_neparovec.
- Available from: <https://www.askbio.com/newly-approved-spinal-muscular-atrophy-gene-therapy-zolgensma-validates-askbio-gene-therapy-platform/>.
- Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=adeno-associated+virus&cntry=&state=&city=&dist=> retrieved on 2021-10-26.