

УДК 578.22:577.29

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228>

Оригинальная статья | Original article



Оценка тропизма и биораспределения синтетических и природных аденоассоциированных вирусных векторов *in vivo* методом секвенирования нового поколения

Д.О. Максимов^{1,2,4}, Д.А. Наумова¹, Е.А. Астахова¹, В.В. Артемьев¹,
С.А. Бирюков¹, И.С. Абрамов^{1,3,4}, А.А. Навойкова¹, Н.В. Рудев^{1,4},
С.Г. Феоктистова^{1,4}, О.В. Глазова^{1,4}, О.Н. Митяева^{1,2,4}, ✉, П.Ю. Волчков^{1,2,3,4}

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Институтский переулок, д. 9, Долгопрудный, Московская область, 141700, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991, Российская Федерация

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы», ул. Новогиреевская, д. 1, Москва, 111123, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», ул. Балтийская, д. 8, Москва, 125315, Российская Федерация

✉ Митяева Ольга Николаевна; mitiaeva.on@mipt.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Создание синтетических векторов на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ) при разработке препаратов для генной терапии является трудоемким и дорогостоящим процессом. Для ускорения и снижения стоимости разработки генотерапевтических препаратов оптимальным представляется совершенствование методов оценки биораспределения и эффективности трансдукции *in vivo* ААВ векторов.

ЦЕЛЬ. Разработка методики биоинформатической оценки библиотек синтетических векторов на основе ААВ для анализа биораспределения и эффективности трансдукции ААВ *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Конструировали синтетические ААВ векторы путем добавления специальной метки (баркода), специфичной для каждого исследуемого серотипа ААВ — 12-нуклеотидной последовательности, фланкированной с 5'-конца кодирующей последовательностью репортерного белка (зеленый флуоресцентный белок). Плазмиды с уникальными баркодами нарабатывали в компетентных клетках *Escherichia coli* XL10-Gold и использовали для сборки ААВ-библиотек: ААВ-библиотека L1 — с количеством вирусных геномов (вг) 10^{10} ; библиотека L2 с количеством вг — 10^{11} . Для продукции ААВ проводили трансфекцию клеток НЕК293Т. Векторы в виде двух ААВ-библиотек вводили внутривенно мышам линии C57B1/6N. Из органов и тканей животных выделяли ДНК и РНК для последующего анализа методом секвенирования нового поколения. Анализировали количество ДНК- и РНК-баркодов в органах мышей для оценки биораспределения и эффективности трансдукции ААВ. Баркоды идентифицировали с помощью выравнивания на ожидаемые последовательности, затем подсчитывали их количество и нормировали на количество в исходной библиотеке.

© Д.О. Максимов, Д.А. Наумова, Е.А. Астахова, В.В. Артемьев, С.А. Бирюков, И.С. Абрамов, А.А. Навойкова, Н.В. Рудев, С.Г. Феоктистова, О.В. Глазова, О.Н. Митяева, П.Ю. Волчков, 2024

РЕЗУЛЬТАТЫ. Созданы 7 вирусных конструкций на основе ААВ различных серотипов, 6 из которых — синтетические (sAAB1, sAAB2, sAAB3, sAAB4, sAAB5, sAAB6), в составе двух ААВ-библиотек. При проведении секвенирования образцов из органов мышей обнаружено значимое количество ДНК-баркодов обеих ААВ-библиотек в образцах всех органов, за исключением мозга. Для библиотеки L1 детектированы РНК-баркоды на достаточном уровне в четырех органах: скелетная мускулатура, сердце, печень и надпочечники; для библиотеки L2 — дополнительно к перечисленным органам в гонадах и почках. При анализе эффективности трансдукции (по уровню РНК-баркодов с поправкой на ДНК-баркоды) показано, что наиболее перспективными вариантами для генной терапии заболеваний печени является sAAB5, а для заболеваний надпочечников — sAAB2 и sAAB6.

ВЫВОДЫ. Разработанная методика биоинформатической оценки библиотек синтетических векторов на основе ААВ позволяет проводить анализ биораспределения и эффективности трансдукции ААВ векторов в организме. Предложенный подход является перспективным для подбора оптимальных ААВ векторов для конкретных органов и тканей при разработке генотерапевтических препаратов.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирус; ААВ; синтетический вектор; библиотека синтетических векторов; ААВ-библиотека; баркодирование; ДНК-баркод; РНК-баркод; серотипы ААВ; секвенирование нового поколения; биоинформатический анализ; биораспределение; эффективность трансдукции *in vivo*; тропизм; генная терапия

Для цитирования: Максимов Д.О., Наумова Д.А., Астахова Е.А., Артемьев В.В., Бирюков С.А., Абрамов И.С., Навойкова А.А., Рудев Н.В., Феоктистова С.Г., Глазова О.В., Митяева О.Н., Волчков П.Ю. Оценка тропизма и биораспределения синтетических и природных аденоассоциированных вирусных векторов *in vivo* методом секвенирования нового поколения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):215–228. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228>

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-64-00002).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

In vivo evaluation of tropism and biodistribution of synthetic and natural adeno-associated viral vectors by next-generation sequencing

Denis O. Maksimov^{1,2,4}, Daria A. Naumova¹, Ekaterina A. Astakhova¹,
Valentin V. Artemev¹, Stanislav A. Biryukov¹, Ivan S. Abramov^{1,3,4},
Anna A. Navoikova¹, Nikolai V. Rudev^{1,4}, Sofia G. Feoktistova^{1,4}, Olga V. Glazova^{1,4},
Olga N. Mityaeva^{1,2,4} ✉, Pavel Yu. Volchikov^{1,2,3,4}

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, 9 Institutsky Ln., Dolgoprudny, Moscow region 141700, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University, 1/3 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation

³ A.S. Loginov Moscow Clinical Research Center, 1 Novogireevskaya St., Moscow 111123, Russian Federation

⁴ Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russian Federation

✉ Olga N. Mityaeva; mitiaeva.on@mipt.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The creation of synthetic adeno-associated virus (AAV) vectors during gene therapy development is a labour-intensive and expensive process. The optimal solution to minimise the time and costs associated with gene therapy development lies in the improvement of methods aimed at assessing AAV vector biodistribution and transduction efficiency *in vivo*.

AIM. This study aimed to develop a new bioinformatics-based assessment method for synthetic AAV vector libraries to analyse AAV vector biodistribution and transduction efficiency *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS. The production of synthetic AAV vectors involved assigning AAV serotype-specific barcodes (12-nucleotide tags flanked at the 5' end with a sequence encoding the green fluorescent reporter protein). Plasmids carrying unique barcodes were propagated in competent *Escherichia coli* XL10-Gold cells and used to create two AAV libraries: L1 with a viral genome count of 10^{10} and L2 with a viral genome count of 10^{11} . AAV production involved HEK293T cell transfection. L1 and L2 library vectors were administered to C57BL/6N mice by intravenous injection. DNA and RNA were isolated from transduced organs for analysis by next-generation sequencing. The obtained data on DNA and RNA barcode quantities in different murine organs were analysed to assess the biodistribution and transduction efficiency of synthetic AAVs. Barcodes were identified by aligning them to the expected sequences and counted. The resulting values were normalised to the quantity of barcodes in the original library.

RESULTS. Seven viral constructs based on different AAV serotypes were created as part of two AAV libraries. Six of the AAV serotypes were synthetic (sAAV1, sAAV2, sAAV3, sAAV4, sAAV5, and sAAV6). Sequencing of murine organ samples revealed significant quantities of DNA barcodes from both AAV libraries in all organs except the brain. For the L1 library, RNA barcodes were detected at a sufficient level in 4 organs, including the skeletal muscles, the heart, the liver, and the adrenal glands. For the L2 library, in addition to the listed organs, sufficient RNA-barcode levels were observed in the gonads and the kidneys. According to transduction efficiency analysis based on RNA barcode levels adjusted for DNA barcodes, sAAV5 was considered the most promising variant for gene therapy of liver-related diseases, whereas sAAV2 and sAAV6 were recognised as holding the most promise for adrenal diseases.

CONCLUSIONS. The developed bioinformatics-based assessment method for synthetic AAV vector libraries can analyse AAV vector biodistribution and transduction efficiency in the body. The presented approach has the potential for selecting optimal AAV vectors for specific organs and tissues in further gene therapy development.

Keywords: adeno-associated virus; AAV; synthetic vector; synthetic vector library; AAV library; barcoding; DNA barcode; RNA barcode; AAV serotypes; next-generation sequencing; NGS; bioinformatics analysis; biodistribution; transduction efficiency *in vivo*; tropism; gene therapy

For citation: Maksimov D.O., Naumova D.A., Astakhova E.A., Artemev V.V., Biryukov S.A., Abramov I.S., Navoikova A.A., Rudev N.V., Feoktistova S.G., Glazova O.V., Mityaeva O.N., Volchkov P.Yu. *In vivo* evaluation of tropism and biodistribution of synthetic and natural adeno-associated viral vectors by next-generation sequencing. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):215–228. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228>

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 23-64-00002).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Векторы на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ) являются перспективным инструментом для генной терапии благодаря способности эффективно доставлять генетический материал в клетки-мишени и низкой иммуногенности [1]. Разные серотипы ААВ имеют различные показатели эффективности трансдукции и биораспределения в органах и тканях [2–4]. Наиболее перспективны для генной терапии те серотипы ААВ, которые селективно трансдуцируют целевые органы-мишени, не затрагивая остальные ткани [5]. Разработка синтетических векторов на основе серотипов ААВ актуальна для достижения оптимальных показателей биораспределения и трансдукции, а также для снижения риска нежелательных

токсических эффектов, в частности иммунных реакций [6–9].

Внесение изменений в гены, кодирующие белки капсида ААВ, при создании синтетических векторов влияет на сродство капсида к рецепторам клеток и, следовательно, на параметры биораспределения вируса в организме [10–12]. В связи с этим при создании синтетических ААВ необходимо проводить их тестирование для изучения показателей биораспределения в тканях и эффективности трансдукции. Для исследования этих показателей наиболее информативными являются методы с использованием животных моделей: биоимиджинг в живом организме; определение сигнала от репортера в извлеченных органах и тканях; количественное определение вирусных частиц (например, с помощью

количественной ПЦР) [13]. Реализация этих подходов подразумевает необходимость тестирования на животных каждого синтетического вектора на основе AAV по отдельности, что является ресурсо- и трудозатратным процессом и препятствует ускоренной разработке векторов для генной терапии [14, 15].

Для решения описанной проблемы авторами данной работы предлагается создание высокопроизводительной скрининговой системы на основе AAV-библиотек, состоящих из нескольких серотипов AAV, что позволит быстро отбирать варианты AAV с интересующими характеристиками биораспределения и трансдукции.

В настоящее время существует несколько систем молекулярного баркодирования AAV-библиотек [16]. В работе K. Adachi с соавт. [17] впервые показано применение технологии баркодирования ДНК с последующим использованием метода секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS) в отношении AAV. Полученные результаты позволили построить функциональную карту капсида AAV, которая выявила аминокислотные замены, влияющие на функциональную активность капсида. Подход, направленный на анализ биораспределения AAV в организме с использованием технологии баркодирования AAV-библиотек, был впервые предложен сотрудниками лаборатории С. Золотухина (Университет Флориды, США) [18]. Анализ биораспределения AAV в тканях после инъекции проводится по оценке ДНК, а анализ тропизма — способности экспрессировать трансген в тканях, регистрируется по оценке уровня РНК [19].

Несмотря на значительный прогресс в области разработки методов для массовой характеристики вариантов капсидов AAV с помощью

NGS-секвенирования [16–18], биоинформатические подходы для анализа данных молекулярного баркодирования в тканях организма остаются несовершенными. В данной работе применялась обобщенная линейная регрессия, что позволило учесть тот факт, что для различных повторов неизбежно получается разное покрытие, а значит и разная достоверность. Это учитывается моделью при оценке среднего. Кроме того, важным новым аспектом данного исследования являлась оценка эффективности трансдукции (тропизм с учетом биораспределения), так как эта оценка имеет важное значение для подбора стратегии проведения генотерапии. Так, например, если вариант вируса обладает высокой эффективностью трансдукции, но из-за особенностей профиля биораспределения в малой степени попадает в целевую ткань, то в этом случае локальная инъекция препарата вируса может быть более предпочтительной.

Цель работы — разработка методики биоинформатической оценки библиотек синтетических векторов на основе AAV для анализа биораспределения и эффективности трансдукции AAV *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента

Схема дизайна эксперимента представлена на рисунке 1.

Баркодирование AAV-библиотек

Для изучения свойств векторов на основе различных серотипов AAV проводили добавление специальной метки (баркода), специфичной для каждого исследуемого серотипа AAV (табл. 1). Баркод представлял собой 12-нуклеотидную последовательность, фланкированную с 5'-конца кодирующей последовательностью

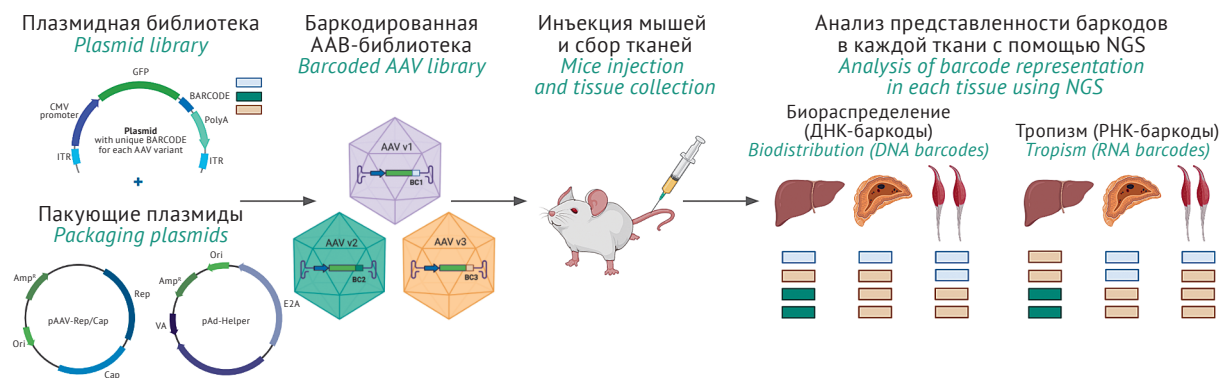


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Дизайн эксперимента. AAV — аденоассоциированный вирус, NGS — секвенирование нового поколения.

Fig. 1. Experiment design. AAV, adeno-associated virus; NGS, next-generation sequencing.

Таблица 1. Серотипы аденоассоциированных вирусных векторов (AAB) и использованные для них баркоды
Table 1. Serotypes of adeno-associated virus (AAV) vectors and the corresponding barcodes

ААВ-библиотека <i>AAV library</i>	Серотип ААВ <i>AAV serotype</i>	Последовательность ДНК баркода (5'–3') <i>DNA barcode sequence (5'–3')</i>
L1, L2	sAAB1/ <i>sAAV1</i>	TTT GTA GTC GAC
L1, L2	sAAB2/ <i>sAAV2</i>	TCA CCT CAA GAC
L1, L2	sAAB3/ <i>sAAV3</i>	GTG AGA TAA TGT
L1, L2	sAAB4/ <i>sAAV4</i>	ATC ATA AAA GTT
L1	sAAB5/ <i>sAAV5</i>	CAT GAT AAT ATG
L1, L2	sAAB6/ <i>sAAV6</i>	TCG ACC TCC CCG
L1	AAB2/ <i>AAV2</i>	GCA ATT GTG ATG

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

репортерного белка (улучшенный зеленый флуоресцентный белок, enhanced green fluorescent protein, EGFP) и с 3'-конца сигналом полиаденилирования мРНК (poly(A) signal) (рис. 2).

Для баркодирования плазмид предварительно амплифицировали репортерный ген (eGFP) с использованием Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (NEB, США) согласно рекомендациям производителя с помощью пула праймеров, из которых обратные праймеры дополнительно несли различные последовательности баркода. Амплифицированные фрагменты клонировали по методу Гибсона с использованием NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, США) согласно рекомендациям производителя. Полученными плазмидами, содержащими репортерный ген с баркодом, трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* XL10-Gold (Aligent) и рассевали их на чашки Петри с агаризованной селективной средой LB (Диаэм, Россия) с антибиотиком. Далее проводили скрининг колоний для подтверждения правильности целевой вставки, после чего наращивали клеточную массу в жидкой питательной среде LB (Диаэм, Россия), выделяли плазмидную ДНК и проводили рестрикционный анализ. Плазмиды, соответствующие требуемой рестрикционной карте, секвенировали (при участии ЗАО «Евроген», Россия).

Всего было собрано 30 конструкций. Плазмиды с уникальными баркодами использовались для сборки ААВ-библиотек: ААВ-библиотека L1 — с количеством вирусных геномов (вг) 10^{10} ; библиотека L2 с количеством вг — 10^{11} .

Сборка ААВ векторов

Для продукции ААВ проводили трансфекцию клеток HEK293Т в присутствии PEI 25K (Polysciences, Индия) тремя плазмидами, несущими следующие гены: 1 — целевой ген eGFP; 2 — гены *rep* и *cap* ААВ (Cell Biolabs, США); 3 — гены-помощники ААВ (гены аденовируса E4, E2, VA) (Cell Biolabs, США) в соотношении 1:1:1 [20].

Подготовка и проверка плазмид выполнялась по стандартным протоколам культивирования и трансформации *E. coli*. После трансфекции и инкубации клетки лизировали в щелочном буфере в присутствии бензоназы (ГенТерра, Россия). Очистку клеточного лизата проводили в градиенте йодоксанола (60, 40, 25, 15%) (Sigma-Aldrich, США) с последующим ультрацентрифугированием на центрифуге Optima XPN-80 Ultracentrifuge (Beckman Coulter, США) в течение 90 мин при температуре 10 °C и 360000 g, с последующей стерилизацией фильтрованием.

Для подсчета количества выделенного ААВ (вг/мкл) использовали количественную

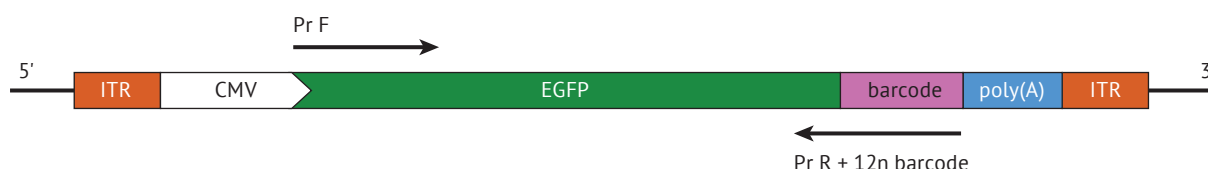


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Общая схема баркодирования плазмид. ITR — инвертированные терминальные повторы; CMV — промотор цитомегаловируса; EGFP — улучшенный зеленый флуоресцентный белок; barcode — баркод; poly(A) — сигнал полиаденилирования; Pr F — прямой праймер; Pr R + 12n barcode — обратный праймер с последовательностью баркода.

Fig. 2. General plasmid barcoding scheme. ITR, inverted terminal repeats; CMV, cytomegalovirus promoter; poly(A), polyadenylation signal; Pr F, forward primer; Pr R + 12n barcode, reverse primer and barcode sequence.

полимеразную цепную реакцию (qPCR) со специфическими к инвертированным терминальным повторам праймерами (fwd ITR primer, 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT; rev ITR primer, 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA) с красителем Sybr Green (ЗАО «Евроген», Россия). В качестве стандартов использовали серию разведений лианеризованной плазмиды с трансгеном, упакованной в капсид ААВ. Перед началом реакции образец обрабатывали ДНКазой (NEB, США) и подвергали последующему термическому воздействию для разрушения капсидов (95 °C, 10 мин).

Исследование с экспериментальными животными

Исследование проводили на мышах-самцах линии C57Bl/6N в возрасте 7 нед. (животные предоставлены НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен локальным Биоэтическим комитетом Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (№ 62-д-з от 16.05.2023). Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях¹.

Было сформировано 3 группы животных, в каждой из которых было по 4 мыши: контрольная группа и две экспериментальные. Животным из контрольной группы водили инъекционно PBS, а животным из экспериментальных групп проводили инъекции ААВ-библиотек (L1 и L2).

Подготовка препарата ААВ и инъекции производились в асептических условиях. Препарат разводили в PBS, конечный объем для инъекции составлял 50 мкл. Готовили растворы ААВ для введения мышам в дозах: векторы ААВ-библиотеки L1 — концентрация 10^{10} вг/животное, ААВ-библиотеки L2 — концентрация 10^{11} вг/животное. Инъекция проводилась в хвостовую вену со скоростью 1 мл/мин.

Через месяц после инъекций животных подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков. Проводили отбор следующих органов: гонады, легкие, головной мозг, скелетная мускулатура, надпочечники, печень, почки, селезенка, сердце, сетчатка глаза, тимус. После извлечения органы помещались в пробирки типа «Эппендорф» объемом 2 мл для последующего анализа.

Подготовка библиотек ДНК и кДНК

ДНК и РНК из органов мышей выделяли с помощью набора для параллельного выделения нуклеиновых кислот HiPure DNA/RNA kit (Magen, Китай). Концентрацию нуклеиновых кислот и наличие примесей оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop™ 2000c (Thermo, США). В качестве опытных образцов для анализа использовали образцы нуклеиновых кислот, выделенных из органов: 88 образцов РНК, 88 образцов ДНК. В качестве контрольных образцов использовали: образцы ААВ-библиотек L1 и L2, которые не вводили животным; отрицательный контроль — 4 образца ДНК и 4 образца РНК, выделенные из органов животных, которым вводили PBS без ААВ; отрицательные контроли всех стадий пробоподготовки — обратная транскрипция (ОТ), 1 стадия ПЦР, 2 стадия ПЦР.

Для получения кДНК использовали набор HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) для синтеза кДНК и удаления геномной ДНК (Vazyme, Китай). Для реакции использовали 1 мкг РНК каждого образца; проводили постановку 1 раунда ПЦР. Праймеры были сконструированы таким образом, чтобы 3'-концы были комплементарны фланкирующей баркод области GFP, а 5'-концы несли последовательности универсальных адаптеров, аналогичных последовательностям набора Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, США).

ПЦР проводили с помощью Q5® High-Fidelity PCR Kit (NEB, США) согласно инструкции производителя. Количество циклов амплификации составляло 20 и было определено в рамках контрольных экспериментов с помощью постановки ПЦР в реальном времени — 200 нг геномной ДНК, выделенной из разных органов, в присутствии флуоресцентного красителя EvaGreen (Biotium, США). Для образцов всех органов показатель количества циклов амплификации (Cq) не превышал 20.

Секвенирование

Секвенирование полученных библиотек проводили с использованием платформы MiSeq (Illumina, США) с помощью набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles).

Биоинформатический анализ результатов секвенирования

Парные чтения, полученные после секвенирования в формате fastq, были картированы на референс с помощью программы

¹ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

minimap2 v.2.26-r1175 [21]. Референс содержал последовательность исходной плазмиды, кодирующей последовательность EGFP и регуляторных элементов (EGFP, ITR), в котором последовательность баркода длиной 12 нуклеотидов кодировалась с помощью 12 символов N (табл. 1). Полученные bam-файлы были отсортированы и индексированы с помощью программы Samtools v.1.17², а затем анализировались с использованием программного обеспечения Jupyter Notebook (python v.3.10.11, библиотеки pysam v.0.21.0, biopython v.1.81 [22]). Сначала выделялись участки чтений, картированные на баркод, затем проводилось попарное выравнивание каждого из этих участков (с длиной больше 5 нуклеотидов) с каждой из референсных последовательностей баркодов с помощью класса PairwiseAligner (параметры scoring = «blastn», mode = «global») из модуля Align пакета Biopython³. Чтобы отсеять возможные баркоды низкого качества, было сгенерировано 100 случайных баркодов и осуществлялось выравнивание с каждым из этих вариантов. В случае если участок чтения имел скор выравнивания (числовая оценка, отражающая степень сходства между двумя последовательностями) на баркод вируса выше, чем на случайный, то вариант вируса считался детектированным. Для каждой библиотеки (ДНК исходной AAB-библиотеки; ДНК или РНК, выделенные из ткани или органа мыши) оценивалось количество каждого из вариантов вируса, при этом в случае, когда левое и правое прочтение детектировали отличающиеся баркоды (таких оказалось всего 3 пары чтений для всех библиотек), пара исключалась из рассмотрения.

Оценка относительного количества баркодов в AAB-библиотеке

Оценка относительного количества производилась независимо для каждого органа или ткани с учетом распределения вирусов (баркодов) исходной AAB-библиотеки. Анализ проводился в RStudio (R v.4.3.1)⁴ с помощью пакетов stats v.4.3.1 и ggplot2 v.3.4.2. Оценка числа детектированных баркодов проводилась с помощью обобщенной линейной модели (функция glm, family = «poisson») по формуле (1):

$$B \approx V + L + \ln(N_{\text{ткань}}) + \ln(N_{\text{Лвирус}}/N_{\text{Лобщ}}) - 1, \quad (1)$$

где, B — число детектированных баркодов конкретного варианта вируса (число ДНК-баркодов

при оценке биораспределения; число РНК-баркодов при оценке тропизма); V — категориальная переменная, которая отражает эффективность варианта вируса в ткани или органе (усредненную по двум AAB-библиотекам); L — поправка на AAB-библиотеку ($L1 = 10^{10}$ вг, $L2 = 10^{11}$ вг); $N_{\text{ткань}}$ — общее количество баркодов, детектированных в образце ткани; $N_{\text{Лвирус}}$ и $N_{\text{Лобщ}}$ — количество баркодов варианта вируса и общее количество баркодов, соответственно, в исходной AAB-библиотеке.

Эффективность трансдукции — способность вируса проникать в клетки и приводить к экспрессии трансгена — величина, представляющая собой тропизм с коррекцией на биораспределение, а в логарифмическом масштабе — разность между вирусной нагрузкой на ткань и показателем эффективности трансдукции вирусом этой ткани. Для лучшей оценки эффективности трансдукции, позволяющей определить стандартную ошибку как в отдельных дата поинтах, так и среднюю, применялась следующая формула (2):

$$B \approx V + RNA_v + L + \ln(N_{\text{ткань}}) + \ln(N_{\text{Лвирус}}/N_{\text{Лобщ}}) - 1, \quad (2)$$

где B — число детектированных баркодов конкретного варианта вируса (ДНК-баркоды и РНК-баркоды варианта вируса в ткани); V и RNA_v — категориальные переменные, отражающие биораспределение и эффективность трансдукции, соответственно, серотипа вируса в ткани/органе (усредненную по двум библиотекам). Переменная RNA_v имеет ненулевое значение, только когда B — РНК-баркоды (для ДНК-баркодов всех вирусов переменная имеет одно значение — «DNA»). Параметры L, $N_{\text{ткань}}$, $N_{\text{Лвирус}}$ и $N_{\text{Лобщ}}$ те же, что и в предыдущей модели.

При сравнении вирусов между собой проводилась оценка отдельно для каждой библиотеки и мыши (без параметра L в формуле, с оценкой параметра V на соответствующем подмножестве данных). Стандартные ошибки оценки параметров определяли с помощью функции «summary» в RStudio (R v.4.3.1)⁵. При графической визуализации значения биораспределения (рис. 5, 6) или тропизма (рис. 7, 8) менее минус 5 были обрезаны до этой точки, а стандартная ошибка установлена как 0. В каждом графике (диаграмма «ящик с усами») (рис. 3–10) использовали следующие элементы: центральная линия — медиана; границы «ящика» — верхний и нижний квартили;

² <https://www.htslib.org/>

³ <https://biopython.org/>

⁴ <https://posit.co/download/rstudio-desktop/>

⁵ Там же.

черные линии («усы») — 1,5-интерквартильный размах; вертикальные красные линии — стандартная ошибка среднего; черные точки — статистические выбросы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сборка баркодированных AAB-библиотек

Секвенирование показало, что 15 из 30 отправленных на секвенирование плазмид, кодирующих EGFP, содержали подтвержденные 12-нуклеотидные баркоды. Среди этих 15 образцов плазмид не было обнаружено повторения баркода. Далее из этих подтвержденных секвенированием образцов были отобраны 7 плазмид с баркодами, которые в дальнейшем использовались для сборки различных серотипов AAB векторов (табл. 1).

Указанные серотипы использовались для составления двух AAB-библиотек (L1 и L2): L1 включала в себя 7 серотипов AAB, L2 — 5 серотипов (табл. 1). Для составления обеих библиотек использовались различные серотипы векторов в равном соотношении. Для инъекционного введения мышам использовали количество вирусных геномов, равное в случае AAB-библиотеки L1 — 10^{10} вг на животное, для L2 — 10^{11} вг на животное.

Контроль качества AAB-библиотек для секвенирования

Перед пробоподготовкой проводилась спектрофотометрическая оценка качества ДНК и РНК по показателю соотношений длин волн. Значения поглощения (A) 260/280 и 260/230 нм соответствовали приемлемым для ампликоновой пробоподготовки образцов высокопроизводительного секвенирования (1,8–2,0 и 2,0–2,2 соответственно). Финальный контроль размера AAB-библиотек проводили с помощью капиллярного электрофреза (биоанализера) Qsep 100 (BiOptic, Китай). Размер AAB-библиотек соответствовал ожидаемому для продукта второго раунда амплификации (продукт 1 раунда + размер индекс-адаптерных последовательностей) с учетом погрешности измерения. В результате оптимизированной пробоподготовки удалось избавиться от коротких димеров праймеров и адаптеров (~150 пб), критически влияющих на расчет реакции секвенирования и дальнейший анализ данных.

Анализ биораспределения и тропизма

В связи с тем что активность используемого в данной работе CMV промотора (рис. 2) варьирует в различных тканях организма, подход, предложенный авторами, заключался в сравне-

нии биораспределения и тропизма различных серотипов AAB в пределах отдельной ткани.

В настоящей работе термин «биораспределение» используется для описания способности вируса достигать ткани и оценивается по количеству ДНК. Достижение вирусом ткани не означает его проникновение в клетки, так как вирусы могут находиться на поверхности клеток. Термин «тропизм» в данной работе используется для описания способности вируса заражать ткань (достигать клетки, проникать в ядро и приводить к экспрессии трансгена) и оценивается по количеству РНК. Термин «эффективность трансдукции» обозначает способность вируса, достигнув ткани, заразить ее, и оценивается по количеству РНК с поправкой на количество ДНК вируса в ткани.

В рамках данного подхода количественное сравнение биораспределения и тропизма используемых серотипов AAB между различными тканями/органами представлялось невозможным.

Для исследования биораспределения оценивалось количество вирусных ДНК-баркодов в целевых тканях и органах мышей (как описано в разделе «Материалы и методы»). По результатам анализа секвенирования удалось обнаружить ДНК-баркоды каждой из AAB-библиотек в каждом из проанализированных образцов органов/тканей (рис. 3). Полученный результат свидетельствует о том, что количество вирусной ДНК в каждом образце оказалось достаточным для проведения амплификации и дальнейшего секвенирования ампликонов.

Следует отметить, что количество ДНК-баркодов в образцах мозга мышей было достаточное для анализа, однако оно было меньше (статистически значимо) относительно среднего числа ДНК-баркодов, обнаруженных в других органах ($p=0,002$, двусторонний тест Вилкоксона). Вероятно, обнаруженные в образцах мозга ДНК-баркоды являются остаточной ДНК, локализованной на стенках сосудов головного мозга мышей. Таким образом, протестированные в данной работе серотипы AAB не способны преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Для исследования тропизма проводилась оценка количества вирусных РНК-баркодов в целевых тканях и органах мышей (рис. 4). Был установлен порог минимального количества детектированных баркодов, равный 10 (красная пунктирная линия на рис. 4), и в рассмотрение включались только те ткани, для которых нижний квартиль числа детектированных баркодов был выше 1. Таким образом, для AAB-библиотеки L1, содержащей меньшее количество AAB (10^{10} вг), удалось детектировать

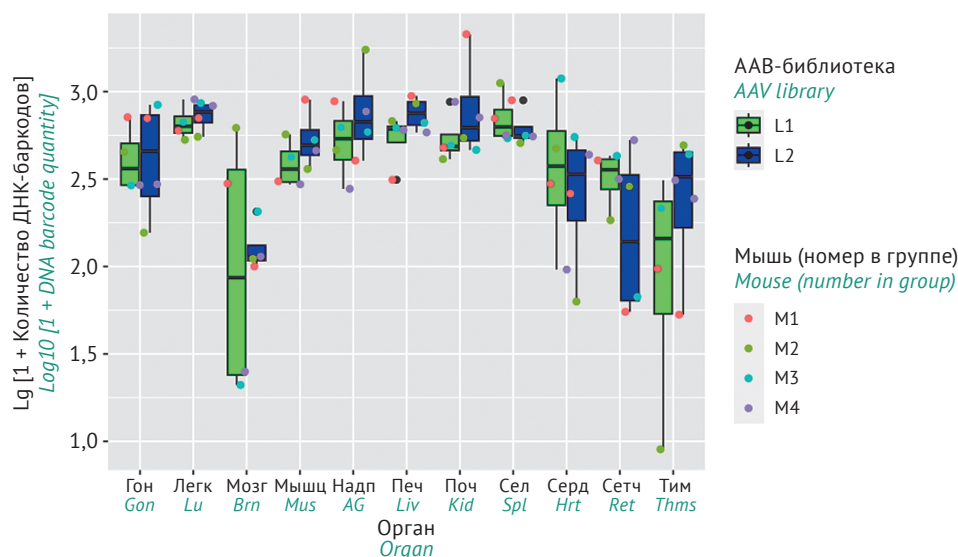


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Биораспределение аденоассоциированного вируса (ААВ) в образцах органов и тканей мышей по количеству ДНК-баркодов после инъекционного введения ААВ-библиотек L1 или L2. По оси X указаны органы/ткани: Гон — гонады, Легк — легкие, Мозг — головной мозг, Мышц — скелетная мускулатура, Надп — надпочечники, Печ — печень, Поч — почка, Сел — селезенка, Серд — сердце, Сетч — сетчатка глаза, Тим — тимус. По оси Y указан десятичный логарифм количества ДНК-баркодов каждой из ААВ-библиотек в каждом из проанализированных образцов органов/тканей. В легенде указаны ААВ-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Черными линиями показан 1,5-интерквартильный размах.

Fig. 3. Adeno-associated virus (AAV) biodistribution in mouse organs and tissues by the quantity of DNA barcodes after injection of AAV libraries L1 or L2. The X-axis indicates organs/tissues: Gon, gonads; Lu, lungs; Brn, brain; Mus, skeletal muscles; AG, adrenal glands; Liv, liver; Kid, kidney; Spl, spleen; Hrt, heart; Ret, retina; Thms, thymus. The Y-axis indicates the decimal logarithm of the quantity of DNA barcodes from each AAV library in each of the organ/tissue samples analysed. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). Black lines show the 1.5-interquartile range.

РНК-баркоды на достаточном уровне только в случае четырех тканей: скелетная мускулатура, сердце, печень и надпочечники. Для ААВ-библиотеки L2, содержащей 10^{11} вг, как и ожидалось, эффективная трансдукция по детектируемому количеству РНК-баркодов (у всех мышей группы) зарегистрирована в большем количестве органов/тканей — дополнительно к вышеуказанным, в почках и гонадах (рис. 4).

Показано практически полное отсутствие экспрессии вирусной РНК в образцах головного мозга и селезенки мышей при использовании обеих ААВ-библиотек. В случае головного мозга отсутствие экспрессии связано, по-видимому, с неспособностью используемых ААВ преодолевать ГЭБ; в случае селезенки возможно влияние других факторов, так как проникновение ААВ в селезенку было подтверждено высоким содержанием ДНК-баркодов в органе.

Анализ биораспределения и тропизма в печени и надпочечниках

Результаты анализа биораспределения показывают высокую согласованность результатов как внутри, так и между ААВ-библиотеками (рис. 5, 6), что позволяет определить се-

ротипы ААВ, способные наиболее эффективно достигать печени и надпочечников (sAAB5 и sAAB2 соответственно).

Результаты анализа тропизма продемонстрировали высокую согласованность для большей части серотипов ААВ (рис. 7, 8). Следует отметить, что для серотипа sAAB2 в надпочечниках и печени имеется значительное расхождение результатов между библиотеками L1 и L2, что, возможно, объясняется небольшим количеством повторов.

Оценка тропизма имеет большое прикладное значение для выбора серотипа ААВ, позволяющего добиться наибольшей экспрессии трансгена в ткани-мишени. Так, среди протестированных серотипов ААВ наиболее перспективным для генной терапии заболеваний, связанных с печенью (например, гемофилии А, В и С), является sAAB5 (рис. 7), а для заболеваний, связанных с надпочечниками (например, для врожденной дисфункции коры надпочечников) — sAAB2 и sAAB6 (рис. 8).

Анализ эффективности трансдукции в печени и надпочечниках

Численные значения, полученные в результате оценки биораспределения и тропизма,

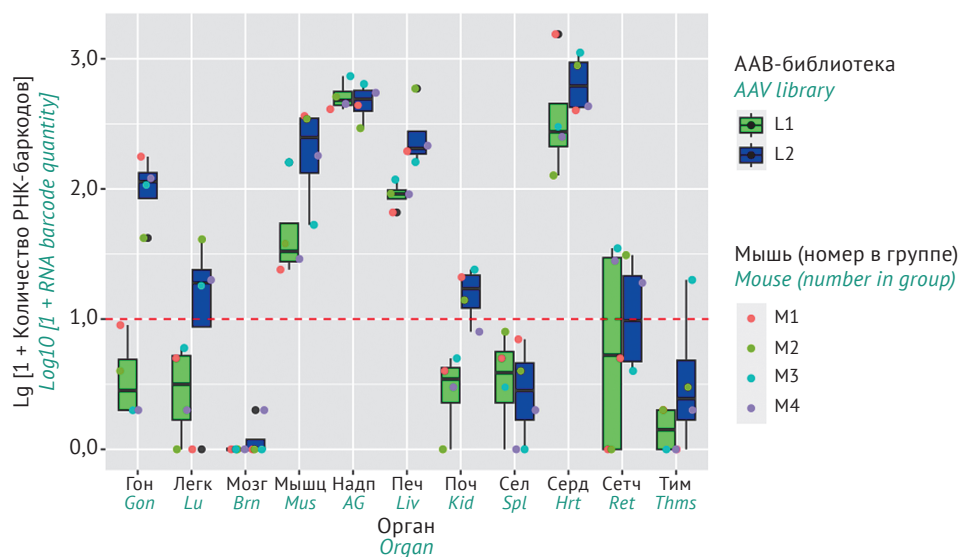


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Тропизм вариантов аденоассоциированного вируса (AAV) к органам и тканям мышей после инъекционного введения AAV-библиотек L1 или L2. По оси X указаны органы/ткани: Гон — гонады, Легк — легкие, Мозг — головной мозг, Мышц — скелетная мускулатура, Надп — надпочечники, Печ — печень, Поч — почка, Сел — селезенка, Серд — сердце, Сетч — сетчатка глаза, Тим — тимус. По оси Y указан десятичный логарифм количества РНК-баркодов каждой из AAV-библиотек в каждом из проанализированных образцов органов/тканей. В легенде указаны AAV-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Черными линиями показан 1,5-интерквартильный размах. Красная пунктирная линия соответствует 9 детектированным баркодам — условная отсечка минимального количества баркодов, допускающая сравнение между серотипами вируса.

Fig. 4. Tropism of adeno-associated virus (AAV) variants to mouse organs and tissues after injection of AAV libraries L1 or L2. The X-axis indicates organs/tissues: Gon, gonads; Lu, lungs; Brn, brain; Mus, skeletal muscles; AG, adrenal glands; Liv, liver; Kid, kidney; Spl, spleen; Hrt, heart; Ret, retina; Thms, thymus. The Y-axis indicates the decimal logarithm of the quantity of RNA barcodes from each AAV library in each of the organ/tissue samples analysed. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). Black lines show the 1.5-interquartile range. The red dotted line corresponds to 9 detected barcodes and represents a cutoff for the minimum quantity of barcodes that allows for comparison between virus serotypes.

представлены в логарифмическом масштабе, поэтому положительные значения указывают на повышенную эффективность трансдукции относительно ожидаемой, а отрицательные — на пониженную.

На рисунке 9 (опубликован на сайте журнала⁶) можно видеть, что серотип sAAB3 обладает пониженной эффективностью трансдукции в печени относительно ожидаемой. Не удалось выявить варианты AAV, обладающие достоверно повышенной эффективностью трансдукцией печени. Так, несмотря на положительные медианные значения эффективности трансдукции у sAAB1, наблюдались большие разбросы между образцами, полученными от разных животных. Вариант sAAB6 обладал повышенной эффективностью трансдукции в надпочечниках (рис. 10, опубликован на сайте журнала⁷), что делает его одним из наиболее эффективных для этого органа, несмотря на низкое количество ДНК (рис. 6). Представленные результаты указывают

на принципиальную важность проведения исследований по характеристике AAV-библиотек не только на уровне ДНК, но и на уровне матричной РНК.

Результаты оценки биораспределения и эффективности трансдукции *in vivo* при использовании AAV векторов

Разработанная методика оценки биораспределения, тропизма и эффективности трансдукции AAV-библиотек позволяет эффективно выявлять серотипы AAV, наиболее перспективные для терапии конкретного органа или ткани. Однако получаемые численные значения, характеризующие эти параметры, могут быть сравнены друг с другом только в рамках конкретного органа или ткани, но не между ними. Это является ограничением данной работы. В связи с этим в дальнейших исследованиях планируется оценивать абсолютные количества вирусной ДНК и РНК с помощью количественной ПЦР с нормализацией на единицу

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228-suppl>

⁷ Там же.

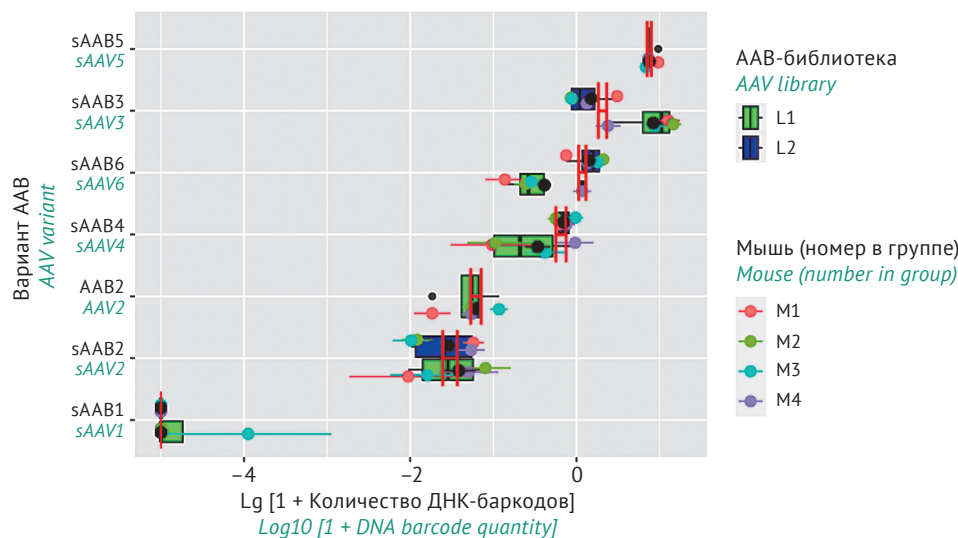


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Количество детектированных ДНК-баркодов в образцах печени после инъекционного введения мышам библиотек аденоассоциированного вируса (AAB) L1 или L2. Вертикальные красные линии отражают стандартную ошибку среднего для каждого из серотипов AAB. В легенде указаны AAB-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Серотипы вирусов по оси Y упорядочены по убыванию вирусной нагрузки.

Fig. 5. Quantity of detected DNA barcodes in liver samples after injection of adeno-associated virus (AAV) libraries L1 or L2 into mice. Vertical red lines represent the standard error of the mean for each AAV serotype. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). The Y-axis lists virus serotypes in descending order by viral load.

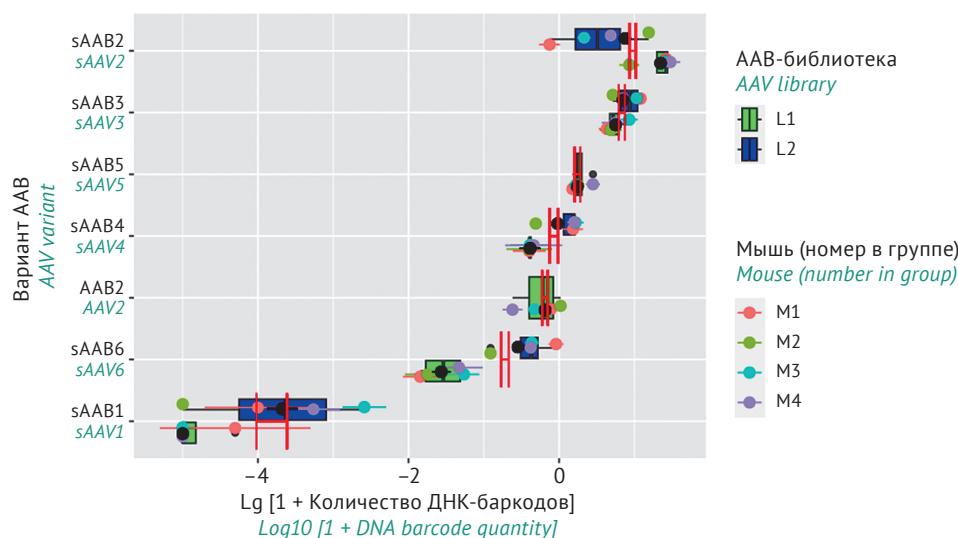


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Количество детектированных ДНК-баркодов в образцах надпочечников после инъекционного введения мышам библиотек аденоассоциированного вируса (AAB) L1 или L2. Вертикальные красные линии отражают стандартную ошибку среднего для каждого из серотипов AAB. В легенде указаны AAB-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Серотипы вирусов по оси Y упорядочены по убыванию вирусной нагрузки.

Fig. 6. Quantity of detected DNA barcodes in adrenal samples after injection of adeno-associated virus (AAV) libraries L1 or L2 into mice. Vertical red lines represent the standard error of the mean for each AAV serotype. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). The Y-axis lists virus serotypes in descending order by viral load.

генома клетки и экспрессию генов домашнего хозяйства (например, GAPDH) соответственно. Однако различные ткани обладают разными уровнями экспрессии GAPDH, что может

привести к систематической ошибке. Несмотря на наличие различных подходов к характеристике AAB, описанных в литературе [16–19], эта проблема остается нерешенной.

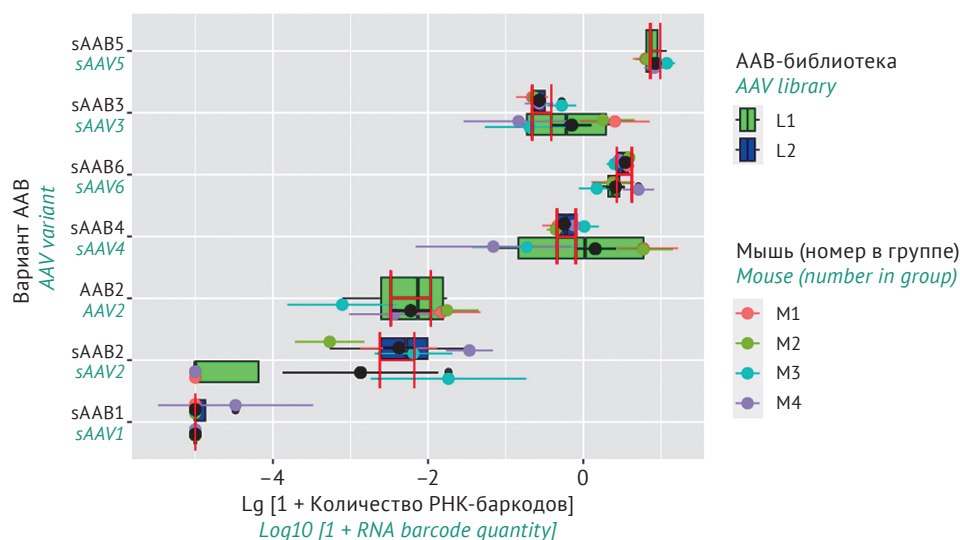


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 7. Количество детектированных РНК-баркодов в образцах печени после инъекционного введения мышам библиотек аденоассоциированного вируса (ААВ) L1 или L2. Вертикальные красные полосы отражают стандартную ошибку среднего для каждого из серотипов ААВ. В легенде указаны ААВ-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Серотипы вирусов по оси Y упорядочены как на рис. 5.

Fig. 7. Quantity of detected RNA barcodes in liver samples after injection of adeno-associated virus (AAV) libraries L1 or L2 into mice. Vertical red lines represent the standard error of the mean for each AAV serotype. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). Virus serotypes on the Y-axis are ordered as in Fig. 5.

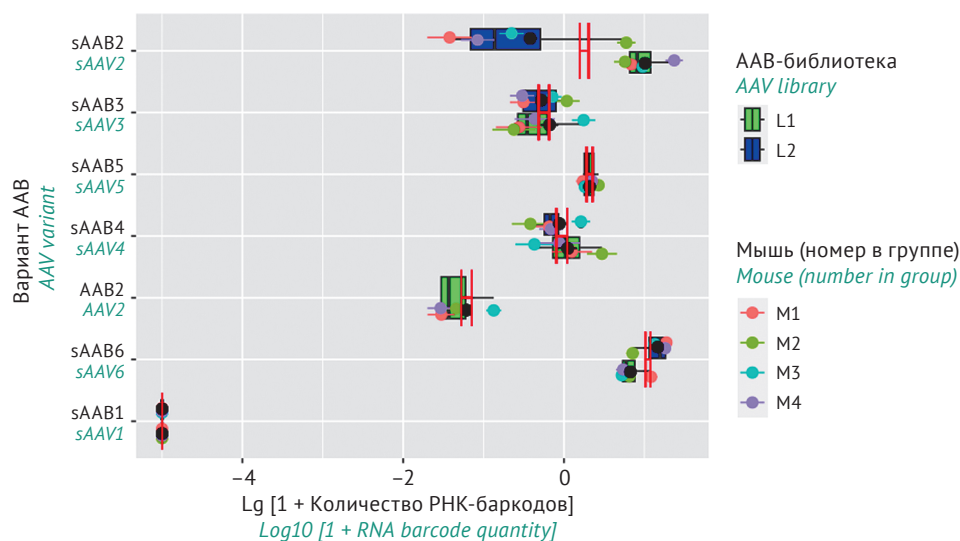


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 8. Количество детектированных РНК-баркодов в образцах надпочечников после инъекционного введения мышам библиотек аденоассоциированного вируса (ААВ) L1 или L2. Вертикальные красные полосы отражают стандартную ошибку среднего для каждого из серотипов ААВ. В легенде указаны ААВ-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Серотипы вирусов по оси Y упорядочены как на рис. 6.

Fig. 8. Quantity of detected RNA barcodes in adrenal samples after injection of adeno-associated virus (AAV) libraries L1 or L2 into mice. Vertical red lines represent the standard error of the mean for each AAV serotype. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). Virus serotypes on the Y-axis are ordered as in Fig. 6.

На рисунках 11 и 12 (опубликованы на сайте журнала⁸) представлены обобщенные данные по биораспределению и тропизму вариантов

ААВ в исследованных органах и тканях. При интерпретации графиков необходимо иметь в виду, что они построены на основе сравнения

⁸ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228-suppl>

вариантов вирусов в каждом органе/ткани не-зависимо. Графики не отражают абсолютных значений, поэтому прямое сравнение значений по отдельным органам между собой невозможно. Из представленных данных видно, что некоторые серотипы AAV обладают широким биораспределением и тропизмом (например, sAAB5, рис. 11⁹), в то время как другие обладают относительной специфичностью, например sAAB2 более эффективен для трансдукции в надпочечниках (рис. 11¹⁰). В целом серотипы с широким биораспределением демонстрируют и широкий тропизм.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод биоинформатической оценки библиотек синтетических векторов на основе аденоассоциированного вируса различных серотипов для исследования биораспределения и эффективности трансдукции *in vivo*.

Литература/References

- 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. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
- Srivastava A. *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol*. 2016;21:75–80. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.003>
- Pañeda A, Vanrell L, Mauleon I, Crettaz JS, Berraondo P, Timmermans EJ, et al. Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum Gene Ther*. 2009;20(8):908–17. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.031>
- Hauck B, Xiao W. Characterization of tissue tropism determinants of adeno-associated virus type 1. *J Virol*. 2003;77(4):2768–74. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.4.2768-2774.2003>
- Han J, Zhu L, Zhang J, Guo L, Sun X, Huang C, et al. Rational engineering of adeno-associated virus capsid enhances human hepatocyte tropism and reduces immunogenicity. *Cell Prolif*. 2022;55(12):e13339. <https://doi.org/10.1111/cpr.13339>
- Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2020;21(4):255–72. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>
- Rode L, Bär C, Groß S, Rossi A, Meumann N, Viereck J, et al. AAV capsid engineering identified two novel variants with improved *in vivo* tropism for cardiomyocytes. *Mol Ther*. 2022;30(12):3601–18. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.07.003>
- Ghuri MS, Ou L. AAV engineering for improving tropism to the central nervous system. *Biology (Basel)*. 2023;12(2):186. <https://doi.org/10.3390/biology12020186>
- Drouyer M, Chu TH, Labit E, Haase F, Navarro RG, Nazareth D, et al. Novel AAV variants with improved tropism for human Schwann cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2024;32(2):101234. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101234>
- Gigout L, Rebollo P, Clement N, Warrington KH, Muzyczka N, Linden RM, et al. Altering AAV tropism with mosaic viral capsids. *Mol Ther*. 2005;11(6):856–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.03.005>
- Wu Z, Asokan A, Grieger JC, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. *J Virol*. 2006;80(22):11393–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.01288-06>
- Asokan A, Conway JC, Phillips JL, Li C, Hegge J, Sinnott R, et al. Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol*. 2010;28(1):79–82. <https://doi.org/10.1038/nbt.1599>
- Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(18):11854–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.182412299>
- Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, et al. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol*. 2004;78(12):6381–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.12.6381-6388.2004>
- Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, Turunen HT, Carvalho LS, Andres-Mateos E, et al. *In silico* reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. *Cell Rep*. 2015;12(6):1056–8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.019>
- Szumaska J, Grimm D. Boosters for adeno-associated virus (AAV) vector (r)evolution. *Cytotherapy*. 2023;25(3):254–60. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2022.07.005>
- Adachi K, Enoki T, Kawano Y, Veraz M, Nakai H. Drawing a high-resolution functional map of adeno-associated virus capsid by massively parallel sequencing. *Nat Commun*. 2014;5:3075. <https://doi.org/10.1038/ncomms4075>
- Marsic D, Govindasamy L, Currllin S, Markusic DM, Tseng YS, Herzog RW, et al. Vector design Tour de Force: integrating combinatorial and rational approaches to derive novel adeno-associated virus variants. *Mol Ther*. 2014;22(11):1900–9. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.139>
- Weinmann J, Weis S, Sippel J, Tulalamba W, Remes A, El Andari J, et al. Identification of a myotropic AAV by massively parallel *in vivo* evaluation of barcoded capsid variants. *Nat Commun*. 2020;11(1):5432. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19230-w>
- Grimm D, Lee JS, Wang L, Desai T, Akache B, Storm TA, et al. *In vitro* and *in vivo* gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-asso-

⁹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228-suppl>

¹⁰ Там же.

- ciated viruses. *J Virol.* 2008;82(12):5887–911.
<https://doi.org/10.1128/jvi.00254-08>
21. Li H. Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2018;34(18):3094–3100.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
22. Cock PJA, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, Dalke A, et al. Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics.* 2009;25(11):1422–3.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Д.О. Максимов** — концепция работы, обработка экспериментальных результатов, подготовка иллюстративного материала; **Д.А. Наумова** — анализ и систематизация источников литературы, формулировка выводов; **Е.А. Астахова** — анализ источников литературы, участие в формулировке выводов; **В.В. Артемьев** — анализ источников литературы, сборка баркодированных конструкций; **С.А. Бирюков** — сборка векторов на основе аденоассоциированного вируса; **И.С. Абрамов** — проведение секвенирования; **А.А. Навойкова** — подготовка плазмид, отработка методов; **Н.В. Рудев** — проведение исследований с лабораторными животными; **С.Г. Феоктистова** — сборка баркодированных конструкций, подготовка рукописи; **О.В. Глазова** — организация и проведение экспериментов с животными, забор биоматериала, выделение и анализ нуклеиновых кислот; **О.Н. Митяева** — планирование экспериментов; утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **П.Ю. Волчков** — утверждение окончательной версии рукописи для публикации. **Соответствие принципам этики.** Экспериментальные исследования с животными проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU. Протокол исследования был одобрен локальным Биоэтическим комитетом Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (№ 62-д-з от 16.05.2023).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **D.O. Maksimov** conceptualised the study, processed the experimental results, and prepared the illustrative material. **D.A. Naumova** analysed and collated literature and formulated the conclusions. **E.A. Astakhova** analysed literature and formulated the conclusions. **V.V. Artemev** analysed literature and assembled the barcoded constructs. **S.A. Biryukov** assembled the AAV vectors. **I.S. Abramov** performed sequencing. **A.A. Navoikova** prepared the plasmids and refined the methods. **N.V. Rudev** conducted the experiments with laboratory animals. **S.G. Feoktistova** assembled the barcoded constructs and prepared the manuscript. **O.V. Glazova** organised and conducted the experiments with laboratory animals, collected biomaterial specimens, isolated and analysed nucleic acids. **O.N. Mityaeva** planned the experiments, approved the final version of the manuscript for publication. **P.Yu. Volchkov** approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The animals were housed and used for experimental procedures in compliance with Directive 2010/63/EU and the recommendations of the Local Bioethics Committee, Lomonosov Moscow State University (Ethics Approval 62-d-z of 16.05.2023).

Об авторах / Authors

Максимов Денис Олегович / Denis O. Maksimov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2937-6082>

Наумова Дарья Алексеевна / Daria A. Naumova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1242-2046>

Астахова Екатерина Андреевна / Ekaterina A. Astakhova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4737-5892>

Артемьев Валентин Владимирович / Valentin V. Artemev

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-1774-6656>

Бирюков Станислав Анатольевич, д-р физ.-мат. наук / Stanislav A. Biryukov, Dr. Sci. (Phys. and Math.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5662-3651>

Абрамов Иван Сергеевич / Ivan S. Abramov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6954-1564>

Навойкова Анна Александровна / Anna A. Navoikova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0224-1396>

Рудев Николай Валерьевич / Nikolai V. Rudev

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2379-0218>

Феоктистова Софья Гумаровна / Sofia G. Feoktistova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-439X>

Глазова Ольга Владимировна / Olga V. Glazova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7199-1866>

Митяева Ольга Николаевна, канд. биол. наук / Olga N. Mityaeva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9252-1601>

Волчков Павел Юрьевич, канд. биол. наук / Pavel Yu. Volchkov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9794-6297>

Поступила 15.04.2024

После доработки 11.06.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 15 April 2024

Revised 11 June 2024

Accepted 21 June 2024