

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390885** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.31

(22) Дата подачи заявки
2017.06.15

(51) Int. Cl. *C07K 14/075* (2006.01)
C12N 15/34 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) ВАРИАНТНЫЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/350,361; 62/404,585**

(32) **2016.06.15; 2016.10.05**

(33) **US**

(62) **201990033; 2017.06.15**

(71) Заявитель:

**ХОВАРД ХЬЮЗ МЕДИКАЛ
ИНСТИТЬЮТ; ДЗЕ РИДЖЕНТС
ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
КАЛИФОРНИЯ (US)**

(72) Изобретатель:

**Лугер Лорен, Хантман Адам,
Терво Дугал Гованлок Робинсон,
Дадман Джошуа, Ритола Кимберли,
Висванатхан Сарада, Карпова Алла,
Хванг Бум-Йеол, Шаффер Дэвид (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к AAV вариантам, которые демонстрируют предпочтение к ретроградному движению в нейронах, и к способам применения таких вариантов.

A1

202390885

202390885

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-554625EA/026

ВАРИАНТНЫЕ АДЕНО-АССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ЗАЯВЛЕНИЕ, КАСАЮЩЕЕСЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ИЛИ РАЗРАБОТОК, СПОНСИРОВАННЫХ ФЕДЕРАЛЬНЫМИ ОРГАНАМИ

Настоящее изобретение выполнено при государственной поддержке в рамках гранта EY022975 Национального института здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на изобретение.

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно ст. 35 U.S.C. 119(e) по заявке на патент США 62/350,361, поданной 15 июня 2016 г., и по заявке на патент США 62/404,585, поданной 5 октября 2016 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение в целом относится к вариантным адено-ассоциированным вирусам и способам их получения и применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Функции головного мозга, такие как восприятие, познавательные функции и контроль движения, зависят от скоординированного действия крупномасштабных нейронных сетей, которые состоят из локальных модулей в виде цепей, выполняющих конкретные вычисления, и связанных между собой длинными связями, по которым распространяются результаты этих вычислений. Такие длинные связи формируются специализированными проекционными нейронами, которые часто включают несколько частично пересекающихся классов, каждый из которых проецируется на другую нижерасположенную в сети мишень. Проекционные нейроны также участвуют в распространении нескольких нейродегенеративных заболеваний из пространственно локализованных участков их возникновения. Таким образом, способность избирательно нацеливаться на определенные классы проекционных нейронов для доставки трансгена (например, для мониторинга/манипуляции активностью или для редактирования генома с целью направленного нокаута гена или исправления патологических мутаций) является важной как для понимания того, каким образом крупномасштабные сети задействованы в работе мозга и, в конечном итоге, для

терапевтического вмешательства при нейродегенеративных заболеваниях.

Вирусные векторы представляют собой важный класс инструментов для введения трансгенов в специфические популяции нейронов, и безусловно, являются наилучшим вариантом генетического доступа к целевым проекционным нейронам через вход в терминали аксонов и ретроградный транспорт их полезной нагрузки в ядра клеток. Несколько видов естественно эволюционирующих нейротропных вирусов, среди которых следует упомянуть вирус бешенства, вирус полиомиелита и вирус простого герпеса (ВПГ), демонстрируют ретроградное распространение в течение своего жизненного цикла. Из них вирус бешенства является особенно нейроинвазивным и быстро распространяется по нервной системе посредством межклеточного переноса. Однако его возможное применение как в биологических исследованиях, так и в генной терапии затруднено из-за чрезмерной вирулентности, хотя в настоящее время наблюдается прогресс в снижении его токсичности. В дополнение к естественным нейротропным штаммам, многие другие вирусы могут инфицировать нейроны при непосредственном введении в нервную систему с помощью вируса «псевдобешенства» (SuHV1, фактически герпесвируса), аденовирусов и лентивирусов, которые чаще всего используются в исследованиях на животных. Собачий аденовирус-2 (CAV-2) демонстрирует наилучшую инфицирующую способность и ретроградный транспорт в этом классе вирусов и все чаще становится предпочтительным реагентом для доступа к проекционным нейронам. Однако CAV-2 обеспечивает только умеренные уровни экспрессии трансгена, является потенциально токсичным и в настоящее время в слабой степени совместим с масштабируемым устойчивым производством для обеспечения клинических исследований или даже исследований на крупных животных. Таким образом, насущной необходимостью остается разработка нетоксичного, легко производимого вирусного вектора, который обеспечивает гибкую упаковку различных трансгенов, устойчиво интернализируется и ретроградно транспортируется аксонами, а также поддерживает длительную высокоэффективную экспрессию полезной нагрузки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Эффективный ретроградный доступ к проекционным нейронам для доставки сенсоров и эффекторов представляет собой важную и полезную возможность для анализа структуры цепи. Такой подход также был бы полезен для генной терапии, включая лечение нейродегенеративных расстройств, для которых характерно распространение патологии через функционально связанные и высоко распределенные сети. В частности, вирусные векторы являются эффективной несущей средой для доставки генов для нервной системы, но недостатком всех доступных инструментов является неэффективный ретроградный транспорт или ограниченные клинические возможности. Чтобы удовлетворить эту потребность, была применена направленная эволюция *in vivo* для введения эффективной ретроградной функциональности в капсид аденоассоциированного вируса (AAV) - вектора, который показал себя многообещающим в исследованиях в области неврологии и в клинике. Описанный здесь вариант, называемый rAAV2-retro, обеспечивает устойчивый ретроградный доступ к проекционным нейронам с эффективностью, сравнимой с классическими синтетическими ретроградными реагентами для мечения, а также высокий уровень экспрессии, достаточный для изучения функциональных цепей и редактирования генома *in vivo* с помощью CRISPR/Cas9 в целевых популяциях нейронов.

В одном из аспектов изобретение относится к вирусному капсидному белку, который включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из xxDxTKx (SEQ ID NO: 1) и xDxTKxx (SEQ ID NO: 2). В одном из вариантов осуществления вирусный капсидный белок имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 или 78. В одном из вариантов осуществления вирусный капсидный белок имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 или 78. В одном из вариантов осуществления вирусный капсидный белок кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15,

17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 или 77. В одном из вариантов осуществления вирусный капсидный белок кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 и 77.

В еще одном аспекте изобретение относится к вирусной частице, которая включает вирусный капсидный белок, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления вирусная частица демонстрирует предпочтение к ретроградному движению. В некоторых вариантах осуществления вирусная частица обладает способностью к ретроградному транспорту.

В некоторых вариантах осуществления вирусная частица, описанная в настоящей заявке, дополнительно включает нуклеиновую кислоту, кодирующую полезную нагрузку. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая полезную нагрузку, включает промоторную последовательность, функционально связанную с кодирующей последовательностью, которая кодирует полезную нагрузку. Типичные промоторные последовательности включают, без ограничения, синапсин-1, CMV, GFAP, CAG, CaMKII, MBR, EF1альфа, TRE и mDlx. В некоторых вариантах осуществления кодирующую последовательность, которая кодирует полезную нагрузку, выбирают из группы, состоящей из кодирующего белок гена и нуклеиновой кислоты - ингибирующей РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, ингибирующая РНК, представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, миРНК или РНКи.

В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой эффекторный белок. Типичные эффекторные белки включают, без ограничения, рекомбиназу (например, Cre или Flp), систему редактирования генов (например, CRISPR/Cas9, TALEN, нуклеазу цинкового пальца), оптогенетические реагенты (активаторы (например, каналный родопсин или его варианты)) или ингибиторы (например, галородопсин или Arch), хемогенетические реагенты (например, версии активатор/ингибитор систем DREADD или PSAM/PSEM), активаторы и/или ингибиторы клеточных сигнальных путей

и ферменты эпигенетического контроля.

В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой оптическую репортерную конструкцию. Типичные оптические репортерные конструкции включают, без ограничения, GCaMP6 (s, m или f), флуорофор (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный GFP (EGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), tdTomato), изменяющую цвет конструкцию (например, полезную нагрузку, которая экспрессирует один репортер в одной клеточной популяции, а другой репортер – в другой популяции), сенсоры глюкозы, jRCaMP, jRGECO и CaMPARI, индикаторы напряжения, вторичные мессенджеры, сигнализаторы рецепторов, транскрипционные репортеры, эпигенетические репортеры и нейромодуляторные репортеры.

В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой вирусный белок. Типичным вирусным белком является G белок вируса бешенства. В некоторых вариантах осуществления вирусный белок представляет собой белок, который дополняет функцию вируса, отличного от AAV, или белок, который относится к клеточному и межклеточному транспорту.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность, которая кодирует полезную нагрузку, представляет собой терапевтический ген. В некоторых вариантах осуществления терапевтический ген предназначен для лечения нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления терапевтический ген представляет собой HSP104 для лечения болезни Альцгеймера или другого заболевания, связанного с токсичными агрегатами белков. В некоторых вариантах осуществления терапевтический ген представляет собой фратаксин для лечения атаксии Фридрейха. В некоторых вариантах осуществления терапевтический ген представляет собой лизосомальную глюкоцереброзидазу (GBA) для лечения болезни Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления терапевтический ген представляет собой полиQ-связывающий белок для лечения болезни Хантингтона. В некоторых вариантах осуществления терапевтический ген представляет собой мотонейрон выживания 1 для лечения мышечной атрофии позвоночника, бокового амиотрофического склероза (ALS), аутизма,

деменции, периферической невропатии, шизофрении или дегенерации сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой терапевтический фрагмент. Типичным терапевтическим фрагментом является антитело или его фрагмент. Типичным терапевтическим фрагментом является иммуномодуляторный белок. Типичным терапевтическим фрагментом является молекула, действующая по принципу РНК-интерференции.

В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы, описанные в настоящей заявке, демонстрируют на два порядка более высокий уровень ретроградного доступа к кортико-понтинным проекционным нейронам по сравнению с собачьим аденовирусом-2 (CAV-2). В некоторых вариантах осуществления ретроградный доступ к кортико-понтинным проекционным нейронам или афферентам к дорсомедиальному стриатуму (DMS) сравним с синтетическим индикатором, флуоресцентными гранулами Fluoro-Gold.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу доставки полезной нагрузки в один или более нейронов. Такой способ обычно включает контактирование одного или более нейронов с вариантным аденоассоциированным вирусом (AAV), который включает полезную нагрузку, упакованную в нем, причем вариантный AAV включает капсидный белок, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из xxDxTKx (SEQ ID NO: 1) и xDxTKxx (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления вариантный AAV имеет ретроградное движение в нейронах.

В некоторых вариантах осуществления нейроны являются проекционными нейронами. В некоторых вариантах осуществления нейроны находятся у пациента (например, в центральной нервной системе (ЦНС) пациента). В некоторых вариантах осуществления пациент является человеком. В некоторых вариантах осуществления пациент не является человеком (например, является приматом, грызуном, рептилией или птицей). В некоторых вариантах осуществления этап контактирования происходит в культуре клеток. В некоторых вариантах осуществления этап контактирования происходит *in vivo* посредством внутречерепной, внутриспинальной или внутримышечной инъекции.

Если не указано иное, все технические и научные термины, которые используются в настоящей заявке, имеют те же самые значения, как их обычно понимают специалисты в области техники, к которой относятся способы и композиции по настоящему изобретению. Несмотря на возможность использования на практике или в испытаниях настоящего изобретения способов и материалов, подобных или эквивалентных тем, которые описаны в настоящем документе, ниже описаны подходящие способы и материалы. В дополнение к этому, материалы, способы и примеры являются всего лишь иллюстрацией и не предназначены для ограничения. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие цитируемые документы, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящее описание путем ссылки.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фиг. 1 показана направленная эволюция rAAV2-retro. На панели А Фиг. 1 схематически представлена процедура направленной эволюции. Библиотеки плазмид, содержащие варианты генов сар AAV, предварительно созданные методом ПЦР с внесением ошибок, вставки пептидов, рандомизированные петлевые участки и ДНК с перестановками упаковывали и инъецировали в черную субстанцию или глубокие ядра мозжечка. Через 3 недели ткани стриатума или заднего мозга, соответственно, удаляли, выделяли вирусные геномы и отобранные гены сар амплифицировали и упаковывали для следующего цикла отбора. На панели В фиг.1 показаны перекрывающиеся субпопуляции корковых нейронов, выступающих в стриатум (полосатое тело) (CP: caudate-putamen (дорсальный стриатум)), таламус и верхнее двухолмие (SC, superior colliculus), ретроградно меченные путем инъекции rAAV2-retro, несущие различные флуоресцентные белки в соответствующее аксональную область.

На Фиг. 2 показаны результаты экспериментов по количественной оценке эффективности ретроградного транспорта. На панели А фиг.2 показан кортико-понтинный тракт, меченный путем инъекции rAAV2-retro в базальное ядро понтинов [В верхней части панели А показана схема эксперимента; соответствие нацеливания и качество инъекции контролировали путем совместно введенной AAV1-CAG-EGFP. В нижней части панели А показан уровень экспрессии через 3 недели после инъекции. Масштабная полоска: 1 мм]. На панели В фиг.2 показана

схема выполнения количественного анализа [В верхней части панели В показана схема эксперимента; стрелка указывает на ожидаемое мечение ядерным GFP в корковых нейронах кортико-понтинного тракта. В средней части панели В представлено репрезентативное изображение мозга с инъецированным AAV2. В нижней части панели В представлено репрезентативное изображение мозга с инъецированным rAAV2retro. Масштабная полоска: 1 мм]. На панели С Фиг. 2 показана схема полуавтоматической процедуры количественного определения. Флуоресцентные ядра (зеленые) автоматически детектировали и подсчитывали вдоль нарисованной вручную линии, указывающей длину кортикального слоя V (черный). На панели D фиг.2 показана эффективность ретроградного транспорта для различных серотипов AAV и для собачьего аденовируса-2 (CAV-2). Планки погрешности представляют SEM. См. также Фиг.8.

На Фиг. 3 показаны результаты экспериментов, демонстрирующие общий принцип ретроградного транспорта, обеспечиваемого rAAV2-retro. На панели А фиг.3 представлены репрезентативные изображения, показывающие обширные меченные зоны в основных входных структурах дорсального стриатума, включая кору (изображение № 1), миндалину (изображение № 3) и таламус (изображение № 4). На панели В фиг.3 показана схема автоматического количественного определения ретроградного мечения во всем мозге. Получали изображения мозга Rosa26-LSL-H2B-GFP с инъецированным hSyn1-Cre rAAV2-retro для визуализации окрашенных DAPI ядер и зеленой флуоресценции в ядрах, экспрессирующих H2B-GFP. Зеленый канал используется для обнаружения меченых нейронов; синий канал выровнен с изображениями Nissl для стандартного мышиного мозга из института исследования мозга Аллена. Выравнивание позволяет распределить обнаруженные нейроны по различным областям, используя аннотацию, предоставленную в атласе мозга. Масштабная полоска: 1,25 мм. На панели С Фиг. 3 показано количественное определение в масштабе всего мозга ретроградного мечения небольшой зоны дорсомедиального стриатума. Сокращения, используемые для обозначения различных областей мозга, даны в соответствии с Атласом мозга Аллена. Стрелка указывает на SNC. Планки погрешности представляют SEM.

На Фиг. 4 представлены данные экспериментов, в которых систему rAAV2-retro объединяли с линиями драйвера Cre. На панели А Фиг. 4 показана схема эксперимента. rAAV2-retro, несущий Cre-зависимый изменяющий цвет флуоресцентный репортер, инъецировали в стриатум Cre-линии, специфической в отношении кортикального слоя V. На панели В фиг.4 показаны два кортикостриарных пути, меченные разными способами: в одном из путей - посредством Cre-зависимой инверсии репортера.

На Фиг. 5 приведены данные экспериментов, показывающие, что rAAV2-retro поддерживает экспрессию трансгена на уровне, достаточном для изучения функциональной цепи. На панели А фиг.5 представлена схема эксперимента. Экспрессия индикатора кальция GCaMP6f ограничена кортико-понтинными нейронами при помощи локализованной инъекции rAAV2-retro в базальные ядра понтинных. Панель В фиг.5 представляет собой поперечное сечение мозга, на котором показана экспрессия GCaMP6f во всем кортико-понтинном тракте. На панели С фиг.5 показана максимальная проекция изображения, полученного методом двухфотонной кальциевой визуализации, показывающего сомы пирамидного тракта слоя V и апикальные дендриты. На панели D фиг. 5 показана активность 89-ти представляющих интерес областей во время выполнения движений с одной свободной рукой (вторая рука зафиксирована) (ломаная линия означает тональный сигнал «go»). Панель Е и панель F на фиг. 5 представляют собой два примера одиночных кортико-понтинных нейронов во время 40 последовательных испытаний (результаты на панели В и на панели D фиг. 5 показаны для одного и того же животного).

На Фиг. 6 приведены данные, показывающие, что система rAAV2-retro позволяет редактировать геном *in vivo* с помощью CRISPR/Cas9. На панели А фиг.6 представлена схема эксперимента [В верхней части панели А показано, что система rAAV2-retro использовалась для доставки *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) - единственной комбинации гидовой РНК, разработанной для уменьшения уровня экспрессии tdTomato. В нижней части панели А показано, что rAAV2-retro, несущий полезную нагрузку SaCas9-anti-tdTomato, инъецировали в базальные ядра понтинных мышей, экспрессирующие

tdTomato из одного геномного локуса в нейронах слоя V]. На панели В фиг.6 представлены репрезентативные изображения срезов головного мозга животных, которым вводили систему CRISPR/Cas9, нацеленную на tdTomato или несущую нецелевую гидовую РНК. SaCas9, меченный эпитопом, позволяет идентифицировать ретроградно меченные нейроны (канал зеленого цвета). Направленные вверх стрелки показывают ожидаемое мечение после успешной абляции tdTomato; направленные вниз стрелки показывают ожидаемое мечение, если экспрессия tdTomato не подверглась воздействию. На панели С фиг.6 показана эффективность абляции. Планки погрешности представляют SEM.

На фиг.7 представлены данные, показывающие, что rAAV2-retro участвует в эффективном доступе к проекционным нейронам у крысы (данные, показанные на фиг.7, относятся к данным, показанным на фиг.1). На панели А фиг.7 представлена схема инъекции. Отдельные партии rAAV2-retro, экспрессирующего EGFP или tdTomato, вводили в стриатум или в верхний бугорок четверохолмия, соответственно. На панелях В-Е фиг.7 показаны проекционные нейроны в различных областях мозга, к которым получен доступ посредством этих локализованных инъекций, с получением изображений через 3 недели после доставки вируса.

На фиг. 8 представлены репрезентативные изображения головного мозга животных, которым инъецировали различные серотипы AAV в базальные ядра понтинов, показывающие, что ни один из встречающихся в природе серотипов AAV не соответствует характеристикам rAAV2-retro в кортико-понтинной цепи (данные, показанные на фиг. 8, относятся к данным, показанным на фиг. 2).

Фиг. 9 представлены данные, показывающие пониженное сродство rAAV2-retro к гепарину по сравнению с его родительским серотипом AAV2 (данные, показанные на фиг. 9, относятся к данным, показанными на фиг. 1). На панели А фиг. 9 представлена схема оценки связывания гепарина. На панели В фиг.9 показана фракция вируса, элюированная путем повышения концентраций NaCl после загрузки в 150 mM NaCl. Фракция загрузки представляет собой вирус, извлеченный из проточной колонки после загрузки образца в 150 mM NaCl. Планки погрешности представляют SD.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV) стали эффективной платформой для генной терапии *in vivo*, поскольку они обеспечивают высокий уровень экспрессии трансгена, нетоксичны и вызывают минимальные иммунные ответы. Эти свойства лежали в основе решения по предоставлению первого полного официального одобрения лечения методами генной терапии путем rAAV-опосредованного восстановления дефицита липопротеинлипазы (см., например, Gaudet et al., 2010, Supplem Atherosclerosis Supplem., 11:55-60). В клинических испытаниях rAAV демонстрируют большие перспективные возможности лечения ряда неврологических расстройств и являются одними из наиболее распространенных векторов, используемых в исследованиях по нейробиологии. После открытия того факта, что AAV может подвергаться ретроградному транспорту (Kaspar et al., 2002, Mol. Ther., 5:50-56), rAAV стали использовать в некоторых исследованиях для ретроградного доступа к проекционным нейронам в избранных цепях, но их природная предрасположенность к ретроградному транспорту является низкой, что затрудняет изучение роли проекционных нейронов в выполнении вычислений цепей или прогрессировании заболеваний.

В настоящей заявке описан новый вариант rAAV (rAAV2-retro), который в дополнение к своей обычной способности инфицировать тела нейронных клеток в месте воздействия надежно интернализуется в аксонах и обеспечивает ретроградный доступ к проекционным нейронам с эффективностью, сравнимой с классическими реагентами ретроградного мечения, такими как синтетические красители. Описанная в настоящей заявке система rAAV2-retro доставки генов может быть использована сама по себе или в комбинации с линиями драйвера рекомбиназы Cre для достижения долгосрочной экспрессии трансгена на высоком уровне, которая является достаточной для эффективного функционального изучения функции нервной цепи, а также для редактирования генома в целевых популяциях нейронов.

При ретроградном транспорте молекулы и/или органеллы доставляются из концов аксонов к телу клетки. Ретроградный аксональный транспорт опосредуется цитоплазматическим динеином и используется, например, для отправки химических сообщений и продуктов эндоцитоза, направляемых в эндолизосомы, из аксона

обратно в клетку. Работая *in vivo* со средней скоростью примерно 2 мкм/с, быстрый ретроградный транспорт может охватывать 10-20 сантиметров в сутки. Быстрый ретроградный транспорт возвращает использованные синаптические везикулы и другие материалы в сому и сообщает соме о состоянии на концах аксонов. Таким образом, используемый в настоящем описании «ретроградный» транспорт относится к движению в аксоне в направлении к телу клетки.

Последовательности нуклеиновых кислот и полипептидов аденоассоциированного вируса (AAV)

Как описано в настоящей заявке, были идентифицированы консенсусные последовательности, которые, если они присутствуют в капсидном белке AAV, приводят к значительному повышению эффективности ретроградного транспорта. Такими консенсусными последовательностями являются xxDxTKx (SEQ ID NO: 1) или xDxTKxx (SEQ ID NO: 2). Для демонстрации эффективности описанных в настоящей заявке консенсусных последовательностей, используемых для обеспечения способности к ретроградному транспорту, создавали семнадцать различных капсидных последовательностей, каждая из которых содержит описанные в настоящей заявке консенсусные последовательности, и было показано их предпочтение к ретроградному движению в нейронах. Последовательности нуклеиновых кислот этих 40 капсидных последовательностей приведены в SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 и 77, а кодируемые капсидные полипептиды, каждый из которых содержит одну из консенсусных последовательностей, описанных в настоящей заявке, приведены в SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 и 78, соответственно.

Дополнительно к капсидным полипептидам, имеющим последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 и 78, представлены полипептиды, которые имеют, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности (например, по меньшей мере, 96%,

по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность последовательности) по отношению к капсидным полипептидам, имеющим последовательности, приведенные в SEQ ID NO: SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 и 78. Аналогично, дополнительно к молекулам нуклеиновой кислоты, имеющим последовательности, приведенные в SEQ ID NO: SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 и 77, приведены молекулы нуклеиновых кислот, которые имеют по меньшей мере 95% идентичность последовательности (например, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность последовательности) по отношению к молекулам нуклеиновых кислот, имеющим последовательности, приведенные в SEQ ID NO: SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 и 77.

При вычислении процентной идентичности последовательностей две последовательности выравнивают и определяют количество идентичных совпадений нуклеотидов или аминокислотных остатков между двумя последовательностями. Количество идентичных совпадений делят на длину выровненной области (т.е., количество выровненных нуклеотидов или аминокислотных остатков) и умножают на 100, получая значение идентичности последовательности, выраженное в процентах. Понятно, что длина выровненной области может быть частью одной или обеих последовательностей вплоть до полной длины самой короткой последовательности. Также должно быть понятно, что одна последовательность может быть выровнена с более чем одной другими последовательностями и, следовательно, может иметь разные процентные значения идентичности последовательности в каждой выровненной области.

Выравнивание двух или более последовательностей для определения процента идентичности последовательностей может быть выполнено с помощью алгоритма, описанного у Altschul et al. (1997, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402) в том виде, как он включен в

программы BLAST (основной инструмент поиска локального выравнивания), доступные по адресу ncbi.nlm.nih.gov во Всемирной паутине. Поиск BLAST можно использовать для определения процента идентичности последовательности между последовательностью (нуклеиновой кислоты или аминокислотных остатков) и любой другой последовательностью или ее частью, выровненной с помощью алгоритма, описанного у Altschul et al. BLASTN – это программа, используемая для выравнивания и сравнения последовательностей нуклеиновых кислот для определения уровня идентичности, в то время как BLASTP – это программа, используемая для выравнивания и сравнения аминокислотных последовательностей для определения уровня идентичности. При использовании программ BLAST для расчета процента идентичности между одной последовательностью и другой последовательностью обычно используются параметры по умолчанию соответствующих программ.

Также предлагаются векторы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды. Векторы, включая векторы экспрессии, являются коммерчески доступными или могут быть получены рекомбинантными методами. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, может иметь один или более элементов для экспрессии, функционально связанных с такой молекулой нуклеиновой кислоты, и дополнительно может включать последовательности, такие как последовательности, кодирующие селективируемый маркер (например, ген устойчивости к антибиотику), и/или последовательности, которые могут быть использованы при очистке полипептида (например, метки 6xHis). Элементы для экспрессии включают последовательности нуклеиновых кислот, которые направляют и регулируют экспрессию кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты. Одним из примеров элемента экспрессии является промоторная последовательность. Элементы экспрессии также могут включать одну или более интронных, энхансерных последовательностей, элементы ответа или индуцибельные элементы, которые модулируют экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты. Элементы экспрессии могут быть бактериальными, дрожжевыми, полученными от насекомого, млекопитающего или вирусными, а векторы могут содержать комбинацию элементов экспрессии из разных источников. Используемый в

настоящей заявке термин «функционально связанный» означает, что элементы экспрессии расположены в векторе относительно кодирующей последовательности таким образом, чтобы они могли направлять или регулировать экспрессию кодирующей последовательности.

Молекула нуклеиновой кислоты, например, молекула нуклеиновой кислоты в векторе (например, векторе экспрессии, вирусном векторе) может быть введена в клетку-хозяина. Термин «клетка-хозяин» относится не только к конкретной клетке(-ам), в которую была введена молекула нуклеиновой кислоты, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Специалистам в данной области известны многие подходящие клетки-хозяева; клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками (например, *E.coli*) или эукариотическими клетками (например, дрожжевыми клетками, клетками насекомых, растительными клетками, клетками млекопитающих). Типичные клетки-хозяева могут включать, без ограничения, A549, WEN1, 3T3, 10T1/2, ВНК, MDCK, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, ВМТ 10, VERO, WI38, HeLa, клетки 293, Saos, C2C12, L клетки, HT1080, НерG2 и первичные фибробласты, гепатоциты и миобласты, полученные от млекопитающих, включая человека, обезьяну, мышь, крысу, кролика и хомяка. Способы введения молекул нуклеиновых кислот в клетки-хозяева хорошо известны в данной области и включают, без ограничения, осаждение фосфатом кальция, электропорацию, тепловой шок, липофекцию, микроинъекцию и вирус-опосредованный перенос нуклеиновой кислоты (например, трансдукцию).

Что касается полипептидов, термин «очищенный» относится к полипептиду (т.е., пептиду или полипептиду), который был отделен или очищен от клеточных компонентов, окружающих в естественных условиях указанный полипептид. Как правило, полипептид считается «очищенным», когда он составляет по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%) относительно сухого веса, не содержит полипептидов и молекул, связанных с ним в естественных условиях. Поскольку химически синтезированный полипептид по природе отделен от сопровождающих его компонентов, синтетический полипептид считается «очищенным», но в дальнейшем его можно выделить из компонентов, используемых для синтеза этого полипептида (например, аминокислотных остатков). Что касается

молекул нуклеиновой кислоты, «изолированный» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая отделена от других молекул нуклеиновых кислот, обычно связанных с ней в геноме. Кроме того, изолированная молекула нуклеиновой кислоты может включать сконструированную молекулу нуклеиновой кислоты, такую как рекомбинантная или синтетическая молекула нуклеиновой кислоты.

Полипептиды могут быть получены (например, очищены) из природных источников (например, из биологического образца) известными методами, такими как ионообменная DEAE, гель-фильтрация и/или гидроксипатитная хроматография. Очищенный полипептид также может быть получен, например, путем экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в векторе экспрессии или химическим синтезом. Степень чистоты полипептида может быть измерена любым подходящим методом, например колоночной хроматографией, электрофорезом в полиакриламидном геле или ВЭЖХ анализом. Аналогично, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены (например, выделены) обычными методами, такими как, без ограничения, методами рекомбинантных нуклеиновых кислот (например, расщеплением и лигированием рестриктазой) или полимеразной цепной реакцией (ПЦР; см., например, PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach & Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995). Кроме того, изолированные молекулы нуклеиновых кислот могут быть химически синтезированы.

Методы получения вирусных частиц, которые демонстрируют предпочтение к ретроградному движению в нейронах

После получения капсидного полипептида или после создания и экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты для получения капсидного полипептида, полипептид может быть упакован в вирусную частицу при помощи, например, упаковывающей клетки-хозяина. Компоненты вирусной частицы (например, последовательности *gag*, последовательности *cap*, последовательности инвертированного концевой повтора (ITR)) могут быть временно или стабильно введены в упаковывающую клетку-хозяина с использованием одного или более векторов. В то время как капсидный полипептид вирусной частицы может содержать консенсусную последовательность, описанную в настоящей заявке, остальные компоненты могут быть из одного или

более известных серотипов AAV (например, AAV2, AAV8 и т.д.).

Такие вирусные частицы могут быть очищены обычными методами. Используемый в настоящей заявке термин «очищенные» вирусные частицы относится к вирусным частицам, освобожденным от компонентов смеси, в которой они были сконструированы, таких как, без ограничения, вирусных компонентов (например, последовательностей *rep*, последовательностей *cap*), упаковывающих клеток-хозяев, и частично или не полностью собранных вирусных частиц.

После сборки вирусные частицы могут быть подвергнуты скринингу, например, на способность к репликации; свойства переноса генов; способность связываться с рецептором; и/или доминирование серотипа в популяции (например, в популяции людей). Определение того, может ли вирусная частица реплицироваться, является обычным в данной области техники и обычно включает инфицирование клетки-хозяина некоторым количеством вирусных частиц и определение, увеличивается ли количество вирусных частиц с течением времени. Определение, способна ли вирусная частица осуществлять перенос гена, также является обычным в данной области и обычно включает инфицирование клеток-хозяев вирусными частицами, содержащими трансген (например, обнаруживаемый трансген, такой как репортерный ген). После заражения и очистки от вируса клетки-хозяева могут быть оценены на наличие или отсутствие трансгена. Определение того, связывается ли вирусная частица со своим рецептором, является обычным методом в данной области техники, и такие методы могут быть выполнены *in vitro* или *in vivo*.

В данной области техники обычно выполняют определение доминирования серотипа вирусной частицы, которое как правило включает использование иммуноанализа для определения доминирования одного или более антител в образцах (например, образцах крови), полученных из конкретной популяции индивидуумов. В данной области техники под доминированием серотипа понимают долю пациентов в популяции, которая является серопозитивной (т.е., подверглась воздействию определенного патогена или иммуногена), и рассчитывается как число пациентов в популяции, которые продуцируют антитело против конкретного патогена или иммуногена,

деленное на общее количество индивидуумов в популяции. В данной области техники хорошо известны иммуноанализы, которые включают, без ограничения, иммунодот, вестерн-блот, иммуноферментный анализ (EIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или радиоиммуноанализ (RIA). Аналогично, известно несколько методов определения уровня нейтрализующих антител в образце сыворотки. Например, в анализе нейтрализующих антител измеряют титр, при котором экспериментальный образец содержит концентрацию антитела, которая нейтрализует инфекцию на 50% или более по сравнению с контрольным образцом, не содержащем антитела. См. также, Fisher et al. (1997, *Nature Med.*, 3:306-12); и Manning et al. (1998, *Human Gene Ther.*, 9:477-85).

Методы использования вирусов, которые демонстрируют предпочтение к ретроградному движению в нейронах

Вирус или его часть, как описано в настоящем документе, можно использовать в различного рода исследованиях и/или для применения в терапии. Например, вирус или его часть, описанные в настоящей заявке, можно использовать в медицине человека или животных для генной терапии (например, в векторе или векторной системе для переноса генов) или для вакцинации (например, для презентации антигена). Более конкретно, вирус или его часть, описанные в настоящей заявке, можно использовать для добавления генов, воспроизводства генов, генетической доставки терапевтического полипептида, генетической вакцинации, сайленсинга генов, редактирования генома, генной терапии, доставки РНКи, доставки кДНК, доставки мРНК, доставки микроРНК, поглощения микроРНК, генетической иммунизации, оптогенетической генной терапии, транскрипции, ДНК-вакцинации или ДНК-иммунизации.

Клетка-хозяин может быть трансдуцирована или инфицирована вирусом или его частью *in vitro* (например, растущая в культуре клетка) или *in vivo* (например, у пациента, например человека или не человека). Клетки-хозяева, которые могут быть трансдуцированы или инфицированы вирусом или его частью *in vitro* описаны в настоящей заявке; клетки-хозяева, которые могут быть трансдуцированы или инфицированы вирусом или его частью *in vivo*, включают, без ограничения, проекционные нейроны (например,

кортико-понтинные проекционные нейроны, симпатические проекционные нейроны, проекционные нейроны центральной нервной системы), афференты к дорсомедиальному стриатуму (DMS), спинальные кортикальные/грибовидные нейроны, прецеребеллярные нейроны, входы в базальные ганглии, преталамические нейроны, двигательные нейроны, сенсорные нейроны или другие нейроны или клетки центральной нервной системы.

Вирус или его часть, описанные в настоящей заявке, могут быть модифицированы путем включения полезной нагрузки. Полезная нагрузка обычно включает по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту (например, промоторную последовательность, функционально связанную с кодирующей последовательностью, которая кодирует полезную нагрузку). В определенных случаях полезной нагрузкой может быть ингибирующая нуклеиновая кислота. В данной области техники известны ингибирующие нуклеиновые кислоты, которые включают, например, антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК (миРНК) и молекулы РНК-интерференции (РНКи). В определенных случаях полезная нагрузка может представлять собой один или более генов, кодирующих белок. Гены, кодирующие белок, включают, без ограничения, оптическую репортерную конструкцию, терапевтический ген или эффекторный белок.

В данной области техники известны многие типы оптических репортерных конструкций, и приведенный ниже список служит в качестве примера и не является исчерпывающим. Например, оптические репортерные конструкции включают, без ограничения, GCaMP6 (GCaMP6s, GCaMP6m или GCaMP6f; см. WO 2014/059154), флуорофор (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный GFP (EGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), tdTomato), изменяющую цвет конструкцию (например, полезную нагрузку, которая экспрессирует один репортерный белок в одной клеточной популяции, а другой репортерный белок - в другой популяции), сенсоры глюкозы, (см., например, заявку на патент США 2015/0111222), jRCaMP (патент США 9,644,007), jRGECO (см., например, патент США 9,644,007), CaMPARI (см., например, патент США 9,518,996), индикаторы напряжения, вторичные мессенджеры, сигнализаторы рецепторов, транскрипционные репортеры,

эпигенетические репортеры и нейромодуляторные репортеры.

Терапевтические гены также известны в данной области техники и их выбор зависит от конкретного заболевания или расстройства, подверженного лечению. Например, терапевтический ген может быть предназначен для лечения нейродегенеративного расстройства. Типичные терапевтические гены (или кодируемый полипептид) и связанные с ними нейродегенеративные расстройства включают, без ограничения, HSP104 для лечения болезни Альцгеймера, Ataxin (например, фратаксин) для лечения атаксии Фридрейха, лизосомальную глюкоцереброзидазу (GBA) для лечения болезни Паркинсона, полиQ-связывающий белок для лечения болезни Хантингтона, мотонейрон выживания 1 для лечения атрофии мышц позвоночника и бокового амиотрофического склероза (ALS), аутизма, деменции, периферической невропатии, шизофрении и дегенерации сетчатки. В некоторых случаях полезная нагрузка может представлять собой терапевтический фрагмент (в отличие от гена). Терапевтические фрагменты включают, например, антитело или его фрагмент, иммуномодулирующий белок или молекулу, действующую по принципу РНК-интерференции (РНКи).

Используемый в настоящей заявке термин «эффекторный» белок относится к любому типу белка, который оказывает влияние на клетку или ее содержимое (например, нуклеиновые кислоты, белки, органеллы или процессы, в которых участвует любой элемент из вышеперечисленных). Например, типичные эффекторные белки включают, без ограничения, рекомбиназы (например, Cre или Flp), системы редактирования генов (например, CRISPR/Cas9, TALEN, нуклеазу цинкового пальца), оптогенетические реагенты (активаторы (например, канальный родопсин или его варианты)) или ингибиторы (например, галородопсин или Arch), хемогенетические реагенты (например, версии активатор/ингибитор систем DREADD или PSAM/PSEM), активаторы и/или ингибиторы клеточных сигнальных путей и ферменты эпигенетического контроля.

Понятно, что может оказаться желательной доставка вирусного белка, который дополняет или подавляет функцию вируса (например, вируса, отличного от AAV). Например, вирусный белок, который является рецептором для проникновения в клетку (например, белок G бешенства, белок, который связан с клеточным и/или межклеточным

транспортом).

Для управления последовательностью, кодирующей полезную нагрузку, можно использовать любое количество промоторов. В данной области известны конститутивные промоторы, а также тканеспецифические промоторы (например, нейрон-специфические промоторы). Исключительно в качестве примера, промотор может быть промотором синапсина-1, CMV, GFAP, CAG, CaMKII, MBR, EF1альфа, mDlx или TRE.

Вирус или его часть, обычно суспендированная в физиологически совместимом носителе, может быть введена пациенту (например, человеку или пациенту, не являющемуся человеком (например, примату, грызуну, рептилии или птице)). Подходящие носители включают физиологический раствор, который может быть приготовлен путем использования различных буферных растворов (например, забуференного фосфатом солевого раствора), лактозы, сахарозы, фосфата кальция, желатина, декстрана, агара, пектина и воды. Вирус или его часть вводят в количествах, достаточных для осуществления трансдукции или инфицирования клеток и для обеспечения уровней, достаточных для переноса и экспрессии генов, позволяющих получить терапевтический эффект, не вызывая при этом чрезмерных побочных эффектов. Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают, без ограничения, внутрочерепную, внутриспинальную или внутримышечную инъекцию. Дополнительные пути введения включают, например, пероральный, интраназальный, интратрахеальный, ингаляционный, внутривенный, внутриглазной, подкожный, внутрикожный, трансмукозальный или другие пути введения. При желании пути введения могут быть объединены.

Доза вируса или его части, вводимая пациенту, зависит главным образом от таких факторов, как состояние, подвергаемое лечению, а также возраст, вес и состояние здоровья пациента. Например, терапевтически эффективная доза вируса или его части, вводимой человеку, обычно находится в диапазоне от примерно 0,1 мл до примерно 10 мл раствора, содержащего концентрации от примерно 1×10^1 до 1×10^{12} копий генома (GC) вирусов (например, от 1×10^3 до 1×10^9 GC). Трансдукцию и/или экспрессию трансгена можно контролировать

в различные моменты времени после введения с помощью анализа ДНК, РНК или белка. В некоторых случаях уровни экспрессии трансгена можно контролировать для определения частоты и/или количества дозы.

Важно отметить, что описанные в настоящей заявке частицы AAV-retro имеют на два порядка более высокий уровень ретроградного доступа к кортико-понтинным проекционным нейронам, чем, например, собачий аденовирус-2 (CAV-2), а ретроградный доступ к некоторым нейронам (например, кортико-понтинным проекционным нейронам или афферентам к дорсомедиальному стриатуму (DMS)) сопоставим с доступом, наблюдаемым в случае синтетического индикатора, такого как флуоресцентные гранулы Fluoro-Gold®.

В соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы общепринятые методы молекулярной биологии, микробиологии, биохимии и методы рекомбинантной ДНК, известные специалистам в данной области. Такие методы подробно описаны в литературе. Изобретение дополнительно описано в приведенных ниже примерах, которые не следует рассматривать как ограничивающие объем способов и композиций, описанных в формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 – Экспериментальные процедуры

Все процедуры выполняли в соответствии с протоколами, утвержденными Исследовательским кампусом Джанелиа (Janelia) и Комитетом по уходу за животными и их использованию Университета Калифорнии в Беркли.

Пример 2. Создание библиотеки и продуцирование вируса.

В начале процедуры направленной эволюции использовали четыре ранее созданные вирусные библиотеки: 1) библиотеку случайного мутагенеза, созданную из гена *cap* AAV2 (кодирующего вирусные белки VP1-3 и активирующий сборку белок (AAP)) методом ПЦР с внесением ошибок (Maheshri et al., 2006, Nat. Biotechnol., 24:198-204); 2) библиотеку вариантов гена *cap* AAV2, содержащих 7-мерные пептидные вставки между N587 и R588 (Müller et al., 2003, Nat. Biotechnol., 21:1040-6); 3) библиотеку вариантов гена *cap* AAV2, содержащих рандомизированные петлевые области (Koerber et al., 2009, Mol.

Ther., 17:2088-95); и 4) библиотеку ДНК перестановок, созданную из последовательностей гена *cap* дикого типа AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8 и AAV9 (Koerber et al., 2008, Mol. Ther., 16:1703-9). Каждый пул мутантной ДНК сначала субклонировали в компетентную по репликации паковую плазмиду AAV для создания библиотеки вирусных плазмид, которые, будучи упакованными в вирионы AAV, могут быть подвергнуты отбору в отношении любого нового свойства или функции. Компетентная по репликации система AAV вводит мутантный ген *cap* в вирусную полезную нагрузку, и, таким образом, генотип каждого варианта связан с его фенотипом. Капсидные последовательности с нужным свойством могут быть затем извлечены путем анализа последовательности ДНК инкапсулированного генома AAV.

Четыре компетентные по репликации библиотеки AAV были упакованы путем временной кальций-фосфатной трансфекции клеток HEK293-T с последующим сбором вируса, центрифугированием в градиенте йодиксанола и фильтрацией на устройстве Amicon (Maheshri et al., 2006, Nat. Biotechnol., 24:198-204).

Пример 3 - *In vivo* инъекция вируса и индикатора

Для локализованной *in vivo* доставки вируса мышей или крыс анестезировали изофлураном (~2% по объему в O₂; SurgiVet, Smiths Medical), и в черепе просверлили небольшое отверстие над местом введения инъекции (см. Таблицу 1). В некоторых участках инъекции вводили несколько инъекций на разную глубину (см. Таблицу 1). В случае инъекции вируса на каждую глубину в ткань медленно вводили ~50-100 нл (мышь) или 250-500 нл (крыса) содержащего вирус раствора. В случае инъекции индикатора в тех же участках, предназначенных для каждой целевой инъекции, вводили 50 нл 5% раствор гранул Fluoro-Gold (Fluorochrome, Denver, CO) в 0,9% NaCl или 100 нл ретро-гранул (LumaFluor, Durham, NC), разведенных в отношении 1:1 в 0,9% NaCl. Инъекции выполняли при помощи вытянутой стеклянной пипетки (проколотой и скошенной до 25-30 мкм (наружный диаметр); Drummond Scientific, *κ*Wiretrol II Capillary Microdispenser), заполненной минеральным маслом. В пипетку вставляли подходящий поршень и продвигали вперед для перемещения содержимого с помощью гидравлического манипулятора (Narashige, MO-10).

Для загрузки пипетки вирусом втягивали плунжер. Инъекционную пипетку устанавливали с помощью манипулятора Sutter MP-285.

Таблица 1. Координаты, использованные в этом исследовании

Мишень для инъекции	Координаты инъекции, мм*
Мышиный SNr	A/P: -3,5; M/L: 1,5; D/V: -4,0 и -4,5
Мозжечок мыши	A/P: 7,1; M/L: 1,4; D/V: -0,8 и -0,5
Дорсомедиальный стриатум мыши	A/P: 0,5; M/L: 1,5; D/V: -2,5 и -2,3
Мышиное ядро понтинов (BPN)	A/P: 0,40; M/L: 0,40; D/V: -5,5, -5,75 и -6,0
Дорсомедиальный стриатум крысы	A/P: 2,16; M/L: 1,7; D/V: -4,3
Верхнее двухолмие крысы	A/P: -6,0; M/L: $\pm 1,8$; D/V: -5,45

*Все координаты A/P даны относительно Брегмы.

Пример 4 – Выбор и оценка библиотеки

Четыре мутантные вирусные библиотеки объединяли и инъецировали либо в SNr, либо в мозжечок взрослых (6-8 недель) мышей дикого типа C57/B16J (любого пола; Charles River). Через три недели после инъекций ткань стриатума или заднего мозга удаляли соответствующим образом, ДНК извлекали, и вирионы, которые успешно достигли удаленной ретроградной ткани-мишени, амплифицировали методом ПЦР и повторно клонировали в пакующую плазмиду rсAAV для создания новой компетентной по репликации библиотеки AAV для следующего цикла отбора. После трех этапов отбора спасенные гены сар были случайным образом мутированы методом ПЦР с внесением ошибок с использованием 5'-ACG CGG AAG CTT CGA TCA ACT ACG CAG-3' (SEQ ID NO: 79) и 5'-AGA CCA AAG TTC AAC TGA AAC GAA TTA AAC GG-3' (SEQ ID NO: 80) в качестве прямого и обратного праймеров, соответственно.

Затем проводили два дополнительных цикла отбора *in vivo*. Отдельные изоляты секвенировали после циклов 4 и 5 для оценки степени обогащения библиотеки (таблица 2).

Таблица 2. Конвергенция последовательностей пептидной вставки для вариантов, изолированных в циклах 4 и 5

Клон	SEQ ID NO клона (нуклеиновая)	Петля	SEQ ID NO петли	E36G	E67A	V182	S207 G	N382 D	N408 S	T567 A	Q598 L	I648 V	V708 I	M235 L	F284 Y	S492	N496	друг ие
4R-H-3	3/4	LAISDQTKH A	81										X					
4R-H-4	5/6	LAISDQTKH A	81						X				X				D	L59P
4R-H-5	7/8	LAKDQTKST A	82						X				X					
4R-H-9	9/10	LANQDYTKT A	83													P		
4R-H-10	11/1 2	LAISDQTKH A	81										X			Y		
4R-H-12	13/1 4	LANQDYTKT A	83	X									X					
4R-H-15	15/1 6	LAISDQTKH A	81										X					
4R-H-16	17/1 8	LAHDITKNI A	84						X				X					
4R-H-17	19/2 0	LAHDITKNI A	84						X				X					
4R-SD-2	21/2 2	LAHDITKNI A	84		X		X		X				X					
4R-SD-3	23/2 4	LAHDITKNI A	84						X				X					
4R-SD-10	25/2 6	LAISDQTKH A	81						X				X					
4R-SD-11	27/2 8	LANQDYTKT A	83			E							X			P		
4R-SD-12	29/3 0	LAISDQTKH A	81					X					X					Q186 R, D5 94N

4R-SD-15	31/3 2	LADQDYTKT A	85										X	X	X			
4R-SD-16	33/3 4	LAI SDQTKH A	81			E			X				X					D69E
4R-SD-17	35/3 6	LAI SDQTKH A	81			E							X				Y	
4R-SD-18		LAHDITKNI A	84						X				X					
5R-Hind1	37/3 8	LAQPDATKN A	86		X	I							X					
5R-Hind2	39/4 0	LAHDITKNI A	84		X		X						X					E12V ,K13 7E
5R-Hind3	41/4 2	LANQDYTKT A	83		X								X					R585 G,S6 62C
5R-Hind6	43/4 4	LADQDYTKT A	85					X					X					
5R-Hind8	45/4 6	LANQDYTKT A	83		X								X					
5R-Hind10	47/4 8	LADQDYTKT A	85	X					X				X					
5R-Hind11	49/5 0	LANQDYTKT A	83	X					X				X					N335 K
5R-Hind12	51/5 2	LAHDITKNI A	84						X				X					
5R-Hind14	53/5 4	LAI SDQTKH A	81										X					S423 N
5R-Hind15	55/5 6	LAI SDQTKH A	81										X					N214 D
5R-Hind16	57/5 8	LAHDITKNI A	84						X				X					
5R-Hind17	59/6 0	LADQDYTKT A	85		X				X				X					

5R-Hind1 8	61/6 2	LAISDQTKH A	81										X					
5R-Hind1 9	63/6 4	LAHDITKNI A	84		X		X		X				X					H38L ,E14 7A
5R-Hind2 2	65/6 6	LANQDYTKT A	83	X									X			P		N227 D,N5 87S
5R-Hind2 3	67/6 8	LAHDITKNI A	84	X	X				X				X					
5R-Ce1	69/7 0	LANQDYTKT A	83		X								X			P		D41G ,K10 5E,G 163D
5R-Ce5	71/7 2	LADQDYTKT A	85							X			X					
5R-Ce6	73/7 4	LAQPDATKN A	86		X		X						X					P29A
5R-Ce8	75/7 6	LAKDQTKST A	82										X					
5R-Ce9	77/7 8	LANQDYTKT A	83		X		X		X				X			P		

Для вторичного скрининга в конце цикла 5 отбирали семнадцать вариантов, и соответствующие последовательности гена сар повторно клонировали в хелперную плазмиду rAAV. Затем, используя Vector BioLabs, Inc (Philadelphia, PA), готовили отдельные препараты с высоким титром родительского AAV2 дикого типа и каждого из 17 выбранных мутантных вариантов, несущих полезную нагрузку CMV-EGFP. Промотор CMV обычно является слабым в нейронах, и, следовательно, этот вторичный скрининг обеспечил жесткую оценку эффективности ретроградного транспорта. Отдельные варианты AAV вводили либо в мозжечок, либо в бледный шар. Через 3 недели эндогенную неамплифицированную флуоресценцию EGFP визуализировали в областях, которые, согласно ожиданиям, в случае эффективного ретроградного транспорта оказались бы мечеными. Мутантный 5R-Hind6 (SEQ ID NO: 43, кодирующая SEQ ID NO: 44) показал наиболее сильный ретроградный транспорт в обеих цепях и, таким образом, был выбран для дальнейшего анализа и получил название rAAV2-retro.

Пример 5 - Анализ связывания гепарина

Сродство AAV2-retro и AAV2 дикого типа к гепарину анализировали, как описано ранее (Jang et al., 2011, Mol. Ther., 19:667-75). Вкратце, примерно 10^{11} очищенных геномных частиц загружали в колонку с гепарином HiTrap объемом 1 мл (GE Healthcare Sciences, Piscataway, NJ), предварительно уравновешенную 150 мМ NaCl и 50 мМ Трис при pH 7,5. Затем выполняли элюцию путем пошагового увеличения концентрации NaCl с 50 мМ до конечной концентрации 950 мМ с последующей промывкой 1М NaCl. Небольшую фракцию каждой элюции использовали для инфицирования клеток HEK293T, и через 48 часов после инфицирования выполняли количественное определение процентного содержания GFP-положительных клеток при помощи проточного цитометра Guava EasyCyte 6HT (EMD/Millipore).

Пример 6 - полезная нагрузка, используемая в исследованиях

Для всех последующих экспериментов промотор CMV заменяли промотором, который, как известно, является более устойчивым во взрослых нейронах. Рекомбиназа Cre и кальциевый индикатор GCaMP6f находились под управлением человеческого промотора синапсина-1 (hSyn1). Все флуорофоры находились под управлением промотора CAG,

а изменяющая цвет конструкция находилась под управлением промотором EF1-альфа.

Пример 7 - Производство вируса для количественного определения ретроградной эффективности

Полезную нагрузку hSyn-Cre упаковывали при помощи капсидов AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9, DJ и AAV2-retro в Janelia Viral Shared Resource. Все семь вирусных препаратов обрабатывали параллельно и перед инъекцией *in vivo* сопоставляли титры. Все партии разбавляли до наименьшего измеренного титра ($1,3E12$ GC/мл), и каждый вирус вводили в правое ядро понтингов трех взрослых мышей Rosa26Lox-STOP-LoxH2B-GFP (He et al., 2012, Neuron, 73:35-48).

Пример 8 - Гистология

Животных умерщвляли через три недели после инъекции вируса, затем вынимали мозг и выполняли сагиттальные срезы правого полушария толщиной 50 мкм. Срезы помещали в нецветящие монтажные среды (Antifade Mounting Media) VECTASHIELD, содержащие DAPI (Vector Laboratories), и отображали с помощью панорамного слайд-сканера P-E (3D Histech) с использованием объектива 20x и фильтров FITC и DAPI.

Пример 9 - Количественная оценка ретроградного транспорта

Изображения, полученные с помощью слайд-сканера с функциями панорамного сканирования, сшивали, а затем анализировали с помощью специального программного обеспечения, написанного на языке Matlab (Mathworks), для обнаружения GFP-меченных ядер во всей коре. Представляющую интерес область (ROI) очерчивали вручную вокруг коры, выделяя область на изображении для автоматического подсчета клеток. Для улучшения обнаружения ядер, выполняли свертку изображения с помощью ядра «Mexican Hat», содержащего разность двух гауссианов (дисперсия 26,00 мкм и дисперсия 3,25 мкм). Шум изображения уменьшали с помощью медианного фильтра, и затем выполняли обнаружение основных пиков.

Пример 10 - Анализ общности ретроградного транспорта

Мышам Rosa26-LSL-H2B-GFP инъекцировали 25 нл hSyn1-Cre rAAV2-retro в дорсальный стриатум. Через три недели после инъекции при помощи панорамного сканера получали изображения коронарных срезов головного мозга для визуализации окрашенных DAPI ядер и зеленой

флуоресценции из ядер, экспрессирующих H2B-GFP. Выполняли свертку зеленого канала с разницей в два гауссиана, и затем на этих пороговых изображениях обнаруживали пики в виде локальных максимумов при помощи пользовательских функций, написанных в Matlab. Синий канал каждого среза выравнивали с изображениями Nissl из атласа стандартизованного мозга мыши Института Аллена, используя обычные пользовательские процедуры, написанные при помощи пакета Matlab Image Processing Toolbox. Затем использовали области из атласа мозга мыши AVI с прилагаемой аннотацией для установления соответствия с обнаруженными нейронами в выровненных участках с конкретными областями мозга.

Было отмечено, что конечная точность эталонного атласа в совокупности с анатомической изменчивостью отдельного головного мозга ограничивает надежность этого полуавтоматического процесса до крупных афферентных входов.

Пример 11 - Визуализация активности популяции нейронов *in vivo* после ретроградной доставки GCaMP6f

Семь взрослых мышей анестезировали изофлураном (2%) и помещали в стереотаксическую рамку (Kopf Instruments; Tujunga, CA) с обогреваемой до 37°C подставкой. Кожу на голове и надкостнице над черепом удаляли, наносили слой УФ-отверждаемого клея OptiBond (Kerr; Orange, CA), и изготовленный на заказ шлем (Osborne and Dudman, 2014, PLoS One, 9 (2):e89007) прикрепляли зубным цементом. AAV2-retro, несущий полезную нагрузку hSynGCaMP6f, инъецировали в BPN (3,9 мм назад и на 0,4 мм вбок от брегмы на глубину 5,8, 5,6 и 5,4 мм по 100 нл для каждой глубины) с помощью инжектора Nanoliter 2010 (WPI). Окно в черепе (одна пластина диаметром 2 мм и толщиной 170 мкм из стекла, вырезанного лазером) помещали поверх первичной двигательной коры (на 0,7 мм вперед и на 1,6 мм вбок от брегмы).

После операции вводили подкожную инъекцию кетопрофена (5 мг/кг) и бупренорфина (0,1 мг/кг; Henry Schein Animal Health; Melville, NY). Мышам давали 1 неделю на выздоровление после операции, а затем выполняли краткую визуализацию под 2-фотонным микроскопом для оценки экспрессии вируса. Через неделю после

инъекции у всех животных визуально идентифицировали клетки, экспрессирующие GCaMP6f, в слое V M1. Затем животных приучали к фиксации головы в изготовленном на заказ устройстве и обучали извлекать пищевой шарик, как описано ранее (Guo et al., 2014, Nat. Med., 20:130-8).

GCaMP6f возбуждали при 920 нм (подавая обычно 20-40 мВт на заднюю апертуру) с помощью лазера Ti:Sapphire (Chameleon, когерентный) и регистрировали через объектив Nikon 16x, 0,8 N.A. Испускаемый свет пропускали через дихроичный фильтр 565 DCXR (Chroma Technology) и фильтр ET525/70m-2p (Chroma Technology) и детектировали с помощью трубки фотоумножителя GaAsP (10770PB-40, Hamamatsu). Изображения (512×512 пикселей) получали при ~30 Гц с помощью резонирующих сканеров, используя программное обеспечение ScanImage.

Пример 12 - редактирование генома CRISPR/Cas9

Промотор CMV в pAAV-CMV-SaCas9-empty (Slaymaker et al., 2016, Science, 351:84-8) заменяли промотором hSyn1 для создания pAAV-hSyn1-SaCas9-empty. Заказывали олигонуклеотиды, кодирующие протоспейсерные последовательности sgPHK, фосфорилировали их, гибридизовали и лигировали в сайты рестрикции BsaI pAAV-hSyn1-SaCas9-empty, получая pAAV-hSyn1-SaCas9-tdTomato-1 до 10. Используемые олигонуклеотидные последовательности были следующими:

tdTomato sgPHK 1 Fwd: CAC CGC AAG GGC GAG GAG GTC ATC A (SEQ ID NO:108)

tdTomato sgPHK 1 Rev: AAA CTG ATG ACC TCC TCG CCC TTG C (SEQ ID NO:87)

tdTomato sgPHK 2 Fwd: CAC CGT GGA GGG CTC CAT GAA CGG CC (SEQ ID NO:88)

tdTomato sgPHK 2 Rev: AAA CGG CCG TTC ATG GAG CCC TCC AC (SEQ ID NO:89)

tdTomato sgPHK 3 Fwd: CAC CGA GGA CGG CGG CCA CTA CCT GG (SEQ ID NO:90)

tdTomato sgPHK 3 Rev: AAA CCC AGG TAG TGG CCG CCG TCC TC (SEQ ID NO:91)

tdTomato sgPHK 4 Fwd: CAC CGA CAA CAA CAT GGC CGT CAT CA (SEQ ID NO:92)

tdTomato sgPHK 4 Rev: AAA CTG ATG ACG GCC ATG TTG TTG TC (SEQ ID NO:93)

tdTomato sgPHK 5 Fwd: CAC CGA AGG ACG GCG GCC ACT ACC TGG (SEQ ID NO:94)

tdTomato sgPHK 5 Rev: AAA CCC AGG TAG TGG CCG CCG TCC TTC (SEQ ID NO:95)

tdTomato sgPHK 6 Fwd: CAC CGA CAA CAA CAT GGC CGT CAT CA (SEQ ID NO:96)

tdTomato sgPHK 6 Rev: AAA CTG ATG ACG GCC ATG TTG TTG TC (SEQ ID NO:97)

tdTomato sgPHK 7 Fwd: CAC CGG TCA CCT TCA GCT TGG CGG T (SEQ ID NO:98)

tdTomato sgPHK 7 Rev: AAA CAC CGC CAA GCT GAA GGT GAC C (SEQ ID NO:99)

tdTomato sgPHK 8 Fwd: CAC CGC CGT ACA TGA ACT GGG GGG A (SEQ ID NO:100)

tdTomato sgPHK 8 Rev: AAA CTC CCC CCA GTT CAT GTA CGG (SEQ ID NO:101)

tdTomato sgPHK 9 Fwd: CAC CGT CTT GTA ATC GGG GAT GTC GG (SEQ ID NO:102)

tdTomato sgPHK 9 Rev: AAA CCC GAC ATC CCC GAT TAC AAG AC (SEQ ID NO:103)

tdTomato sgPHK 10 Fwd: CAC CGC CGT CCT GCA GGG AGG AGT C (SEQ ID NO:104)

tdTomato sgPHK 10 Rev: AAA CGA CTC CTC CCT GCA GGA CGG C (SEQ ID NO:105)

Сначала оценивали *in vitro* способность каждого олигонуклеотида направлять редактирование генома. Клетки Neuro2A трансфицировали 800 нг pAAV-hSyn1-SaCas9-tdTomato-1 до -10, 100 нг pAAV-FLEX-CAGtdTomato и 100 нг pAAV-CAG-EGFP, используя полиэтиленимин. Через 72 часа после трансфекции клетки собирали, и ~70000 EGFP-положительных клеток Neuro2A выделяли, используя флуоресцентно-активированный сортинг клеток (FACS) при помощи BD Influx сортера (BD Biosciences). Затем геномную ДНК

экстрагировали, и частоту модификации гена tdTomato оценивали при помощи нуклеазного анализа Surveyor (Integrated DNA Technologies), как описано ранее (Cong et al., 2013, Science, 339:819-23). Одну из двух sgРНК 7, которые, по-видимому, управляли двумя событиями расщепления в последовательности tdTomato, упаковывали в retro-AAV2 и использовали для редактирования генома *in vivo*.

Затем, ~100 нл (5×10^{13} векторных геномов (vg)/мл) AAV2-retro-hSyn1-SaCas9-tdTomato или AAV2retro-hSyn1-SaCas9-empty инъецировали в ВРН мышей Rbp4-Cre × tdTomato, как описано выше. Через шесть недель после инъекции головной мозг вынимали, делали коронарные срезы толщиной 40 мкм и окрашивали НА-меченной Cas9 (анти-НА антителом C29F4 от Cell Signaling, разведенным 1:1600; вторичное антитело: ослиное анти-мышинное Alexa Fluor 488 (1:250; Jackson ImmunoResearch) и нейрональным маркером NeuN (анти-NeuN антителом A60 от Millipore, разведенным 1:250; вторичное антитело: ослиное анти-кроличье Alexa Fluor 647 (1:500; ThermoFisher, A-31573)). После окрашивания антителом срезы помещали на предметные стекла в нецветящую монтажную среду VECTASHIELD, содержащую DAPI (Vector Laboratories), и визуализировали при помощи инвертированного микроскопа Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss). Количественную оценку иммуноокрашивания проводили, используя программное обеспечение для анализа ImageJ (NIH).

Пример 13 - направленная эволюция rAAV2-retro

Для создания новых rAAV с усиленным ретроградным транспортом, разрабатывали подход направленной эволюции *in vivo*, приводящий обогащению вариантами капсидов rAAV, которые эффективно транспортируются в клеточные тела нейронов, посылая длинные проекции в участке инъекции вируса в мозге мыши (фиг. 1A). Для обеспечения максимальной вероятности извлечения варианта с нужными свойствами, в качестве исходного материала использовали разнородную смесь ранее описанных библиотек вариантов cap rAAV (Koerber et al., 2008, Mol. Ther., 16:1703-9; Koerber et al., 2009, Mol. Ther., 17:2088-95; Koerber et al., 2006, Nat. Protocols, 1:701-6; Müller et al., 2003, Nat. Biotechnol., 21:1040-6). Вирусные частицы упаковывали таким образом, чтобы каждый

вариантный капсид был связан с геном AAV, содержащим соответствующий ген сар, и окончательный пул вариантов капсида включал точечные мутанты, варианты со случайной вставкой 7-мерного пептида в область AAV2, используемую для связывания его корцептора, гепарансульфата, со случайными химерами последовательностей капсидных генов из семи родительских серотипов (рис. 1А). Для идентификации вариантов с широким ретроградным тропизмом выбирали две независимые популяции проекционных нейронов: стриарные ГАМК-эргические нейроны, проецирующие сигналы в ретикулярную часть черной субстанции (SNr), и глутаматергические нейроны задней части мозга, проецирующие сигналы в кору мозжечка. Через три недели после инъекции всего пула вариантов rAAV в SNr или мозжечок (одна инъекция на животное), ткань стриатума или ткань задней части мозга, соответственно, вынимали, последовательности сар восстанавливали методом ПЦР, и вирус переупаковывали (фиг. 1В). После еще двух этапов отбора выполняли ПЦР с внесением ошибок для дальнейшей диверсификации библиотек, за которой следовали два заключительных этапа отбора *in vivo*.

30 вариантов сар секвенировали после 4-го цикла эволюции, большинство из которых происходило из инсерционной библиотеки и содержало экзогенные 7-мерные пептиды между N587 и R588 гена капсида AAV2 VP1 дикого типа. Интересным оказалось то, что все восстановленные вставки имели форму LАххDхТКхА (SEQ ID NO: 106) или LАхDхТКххА (SEQ ID NO: 107) (где остатки, выделенные жирным шрифтом и курсивом, получены из вставки); мутации в других местах последовательности также были обогащенными (таблица 2). После 5-го цикла эволюции секвенировали еще 22 клон, и после этого дополнительного цикла эволюции все последовательности оказались мутантами AAV2 со вставками LАххDхТКхА (SEQ ID NO:106)/LАхDхТКххА (SEQ ID NO:107) (таблица 2), демонстрируя заметную степень дальнейшей конвергенции. Такая конвергенция предполагает, что специфические пептидные вставки в гепарин-связывающую петлю являются очень важными для проявления ретроградной функциональности с потенциальным вторичным вкладом других сайтов.

Затем выполняли вторичный скрининг семнадцати выделенных вариантов, имеющих различные комбинации пептидных вставок и

точечных мутаций в последовательности капсида. Для обеспечения очень жестких условий, выбранные варианты упаковывали с трансгеном усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP), управляемым промотором CMV, который обычно слаб в нейронах. Для каждого варианта капсида оценивали его способность доставлять достаточный уровень полезной нагрузки к клеточным телам в ключевых афферентных областях, что позволяло обнаруживать сигнал EGFP, не усиленный антителами, через три недели после инъекции. Для дальнейшего анализа отбирали клон (вставка LADQDYTKTA (SEQ ID NO:85)+V708I+N382D), который демонстрировал наиболее сильный ретроградный транспорт в двух независимых цепях в этом вторичном тесте (из коры в бледный шар и из нижней оливы/базального ядра понтинов к мозжечку), который назвали rAAV2-retro. При оценке двух дополнительных промоторов, обычно используемых в исследованиях на грызунах *in vivo* (CAG - фиг. 1B или человеческого синапсина-1, данные не показаны), в ряде различных цепей у мышей и крыс была отмечена заметная эффективность ретроградного мечения с этим вариантом rAAV (фиг. 1B и фиг. 7). Замена 7-мерной вставки на одну из других восстановленных последовательностей или добавление дополнительных точечных мутаций, идентифицированных в тесте, не привели к дальнейшему увеличению ретроградного транспорта.

Пример 14 - Эффективный ретроградный доступ к проекционным нейронам

В нисходящих моторных путях кортико-понтинный тракт является заметно конвергентным и, как известно, вносит более 95% афферентов в базальные ядра понтинов (BPN). Таким образом, этот путь представляет собой особенно выгодную систему для количественной оценки эффективности поглощения вирусов и ретроградного транспорта аксональными окончаниями проекционных нейронов. Действительно, инъекция rAAV2-retro в BPN приводила к получению плотной окраски нейронов слоя V (фиг. 2A), что согласуется с результатами предыдущих исследований по мечению (Legg et al., 1989, *J. Comp. Neurol.*, 286 (4):427-41).

Затем при идентичных условиях заражения и обработки сравнивали эффективность ретроградного транспорта в кортико-понтинной цепи для rAAV2-retro по сравнению с несколькими обычно

используемыми серотипами AAV (фиг. 2B-D). Для обеспечения точности количественного определения и устранения возможного искажения результатов по межклеточной изменчивости в уровне экспрессии трансгена для доставки рекомбиназы Cre в трансгенных мышах Rosa26-Lox-STOP-Lox-H2B-GFP использовали AAV (He et al. 2012, Neuron, 73:35-48). Было показано, что даже низкой концентрации фермента Cre достаточно для запуска экспрессии такой Cre-зависимой кассеты, а жесткая ядерная локализация слитого с гистонем репортера позволяет однозначно идентифицировать инфицированные клетки, без искажений сигнала из нейропиля.

Расчет линейной плотности инфицированных проекционных нейронов коры головного мозга в визуализированных сагиттальных срезах из мозга мышей, полученного через три недели после локальной инъекции вируса в BPN выполняли в режиме полуавтоматического анализа (фиг. 2C). У животных, инфицированных rAAV2, наблюдали минимальную экспрессию кортикального GFP (линейная плотность $0,98 \pm 0,20$ нейронов/мм, среднее \pm sem, n=5; фиг. 2B, средняя панель). По всей rostro-каудальной оси коры у животных, которым инъецировали rAAV2-retro, напротив, согласно более ранним наблюдениям (фиг. 2A), можно наблюдать плотный слой проекционных нейронов GFP-позитивного слоя V (линейная плотность $130,11 \pm 11,08$ нейронов/мм, n=4; фиг. 2B, нижняя панель). Ни один из других широко используемых серотипов AAV, ни собачий аденовирус-2, не соответствовал ретроградной эффективности сконструированного варианта rAAV2-retro (линейная плотность AAV1: $0,05 \pm 0,04$, AAV2: $0,98 \pm 0,2$, AAV5: $2,38 \pm 1,24$, AAV8: $1,43 \pm 1,43$, AAV9: $1,98 \pm 0,86$, DJ: $24,82 \pm 14,32$, CAV-2: $5,56 \pm 4,13$, n=3-5 для каждого; фиг. 2D, фиг. 8). Кроме того, плотность проекционных нейронов коры, меченных rAAV2-retro, была сопоставима с плотностью, достигнутой с помощью гранул Fluoro-Gold (Schmued and Fallon, 1986, Brain Res., 377:147-54), надежного синтетического ретроградного индикатора (линейная плотность 81.03 ± 11.08 нейронов/мм, n=3). Таким образом, rAAV2-retro демонстрирует усиление ретроградного доступа к кортико-понтинным проекционным нейронам на два порядка по сравнению с существующими серотипами и конкурирует с эффективностью

синтетических ретроградных индикаторов.

Пример 15 - Общность ретроградной функциональности

Далее изучали, распространяется ли ретроградная функциональность rAAV2-retro на другие цепи, в частности, путем определения степени, в которой им оказались мечеными различные афференты в дорсомедиальном стриатуме (DMS) - части базальных ганглиев, которая получает длинные входные сигналы из множества корковых и подкорковых областей. Было обнаружено, что эффективность опосредованного rAAV2-retro ретроградного доступа к наиболее сильным афферентным входам в DMS - кору, таламус и миндалину - была сопоставима с эффективностью флуоресцентных гранул, классически используемых для ретроградного мечения (фиг. 3А). Для обеспечения объективности в оценке количества ретроградно меченных нейронов во всех областях мозга, о которых известно, что они обеспечивают значительный длинный входной сигнал в DMS, разработали алгоритм, который позволяет соотносить любую обнаруживаемую флуоресцентную метку в визуализированном участке мозга мыши с определенными областями мозга путем выравнивания секции, используя атлас мозга Аллена с аннотацией (Рисунок 3В-С). Количественный анализ (фиг. 3С) показал, что сильное ретроградное мечение было обнаружено в подавляющем большинстве областей, о которых ранее сообщалось, что они посылают заметные проекции к стриатуму (Pan et al., 2010, Front Neuroanat., 4:147). В одном явно выраженном исключении, наблюдается только слабое мечение в компактной части черной субстанции, несмотря на то, что она является источником сильных дофаминергических входных сигналов в DMS (фиг. 3С, стрелка, указывающая на количестве клеток для SNc). Было обнаружено, что в некоторых других протестированных цепях небольшое подмножество классов проекционных нейронов также является невосприимчивым к ретроградному доступу, обеспечиваемому rAAV2-retro (таблица 3; следует отметить, что эти проекции также оказались не мечеными всеми другими протестированными серотипами AAV). Несмотря на эти исключения, rAAV2-retro является широко применимым в центральной нервной системе.

Таблица 3. Эффективность rAAV2-retro в различных цепях. Низкая эффективность, а не отсутствие ретроградного транспорта в

кортико-таламической и кортико-колликулярной проекциях, подтверждается эффективным мечением проекционных нейронов после локальной доставки Cre-зависимых полезных нагрузок в тела проекционных нейронных клеток.

<u>Место инъекции</u>	<u>Местоположение целевых проекционных нейронов</u>	<u>Эффективность мечения</u>	<u>Трансген</u>
мышиний mPFC (IL/PL)	MEC	сильная	Cre
мышиний mPFC (IL/PL)	LEC	сильная	Cre
мышиний mPFC (IL/PL)	Контр-mPFC	сильная	Cre
мышиний mPFC (IL/PL)	Медиадорсальный таламус	средняя	Cre
мышиний mPFC (IL/PL)	Соединяющее ядро таламуса	средняя	Cre
мышиний mPFC (IL/PL)	Островковая область	сильная	Cre
мышиний mPFC (IL/PL)	Гиппокамп- вентральный CA1	сильная	Cre
мышиний mPFC (IL/PL)	AcG	сильная	Cre
OFC	MEC	сильная	Cre
OFC	LEC	сильная	Cre
OFC	Контр-OFC	сильная	Cre
OFC	Островковая область	сильная	Cre
OFC	Гиппокамп- вентральный CA1	средняя	Cre
дорсальный CA1	MEC	сильная	Cre
дорсальный CA2	LEC	сильная	Cre
дорсальный CA3	CA3	слабая	Cre
дорсальный CA4	Соединяющее ядро таламуса	слабая	Cre
дорсальный CA4	Соединяющее ядро таламуса	слабая	Cre-Cre
миндалина	mPFC	сильная	Cre
Латеральный гипоталамус	mPFC	сильная	Cre
Дорсомедиальный стриатум	mPFC	сильная	Cre
Вентральный стриатум (NAcc)	mPFC	сильная	Cre
MEC	mPFC	средняя	FLPo
mPFC	Вентральный CA1	средняя	FLPo
mPFC	MEC	средняя	FLPo
Опорная структура	Прилежащее ядро	средняя	Cre
Опорная структура	Вентральный гиппокамп	сильная	Cre
Опорная структура	Переднее промежуточное ядро таламуса	средняя	Cre
Опорная структура	Ретроспинальная кора	сильная	Cre
Опорная структура	Латеральная энторинальная кора	сильная	Cre
Опорная структура	Медиальная энторинальная кора	сильная	Cre
Верхнее двухолмие	Слой 5 в зрительной коре	очень слабая	Gcamp6s
Верхнее двухолмие	Слой 5 в зрительной коре	сильная	Cre
dLGN	Слой 6 в зрительной коре	очень слабая	Gcamp6s
dLGN	Слой 6 в зрительной коре	сильная	Cre
Зрительная кора	Контралатеральная зрительная кора	сильная	Cre
Зрительная кора	Контралатеральная зрительная кора	сильная	GFP
Зрительная кора	Контралатеральная зрительная	слабая	Gcamp6s

	кора		
Зрительная кора	Контралатеральная зрительная кора	сильная	tdtomato
Зрительная кора	LGN	сильная	tdtomato
Зрительная кора	Ограда	сильная	tdtomato
Зрительная кора	Ограда	средняя	tdtomato
Зрительная кора	LM	сильная	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	M1	сильная	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	M1	средняя	GFP
Дорсолатеральный стриатум	M2	сильная	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	Соматосенсорная кора	сильная	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	Базолатеральная миндалина	сильная	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	Островковая область	сильная	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	Энторинальная кора	сильная	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	Бледный шар	средняя	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	Таламус	средняя	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	Интраламинарное ядро таламуса	сильная	GFP
Дорсолатеральный стриатум	Ядро шва	очень слабая	tdtomato
Дорсолатеральный стриатум	VTA	слабая	tdtomato
Базолатеральная миндалина	Вкусовая зона коры	сильная	flex-tdtomato
Моторная зона коры передних конечностей	Моторный таламус	слабая	GFP
Ядро одиночного пути	Латеральная миндалина	средняя	tdtomato
Спинной мозг	Кора	сильная	flex-tdtomato
Спинной мозг	Кора	сильная	GFP
Спинной мозг, пластинка IX	Спинной мозг: пресинаптические ингибирующие нейроны	сильная	flex-tdtomato
Мышцы	Спинальные моторные нейроны	средняя	Cre
Мышцы	Проприоцептивные нейроны	сильная	Cre

Пример 16 – Ретроградный доступ к генетически определенной популяции нейронов

Также определяли, можно ли комбинировать ретроградную функциональность rAAV2-retro со специфичностью Cre-трансгенных линий для возможности изучения проекционных нейронов определенных классов. В частности, проводили эксперименты по определению, можно ли комбинировать rAAV2-retro и Cre-трансгенные линии для разделения двух функционально разных длинных связей, которые проходят параллельно между двумя областями мозга. Проекция от коры головного мозга к стриатуму возникает в основном из нейронов в

слое V, но некоторые нейроны в слоях II и III также обеспечивают входы в стриатум. Было высказано предположение, что входы в стриатум из разных кортикальных слоев формируют отдельные пути, причем нейроны в слое V проецируют в стриосомный (patch) компартмент стриатума, а в слоях II и III - в матриксный компартмент. Пальцеобразная форма микрокомпарментов patch и матрикса затрудняет избирательное нацеливание на эти пути для функционального изучения только с помощью системы rAAV2-retro. Поэтому была проанализирована возможность разделения двух входов путем объединения rAAV2-retro с трансгенной линией, экспрессирующей рекомбиназу Cre во всех нейронах слоя V (Gerfen et al., 2013, Neuron, 80: 1368-83), но не в нейронах слоев II и III (фиг. 4A).

Для демонстрации обоих путей в одном и том же эксперименте, была выбрана Cre-зависимая изменяющая цвет полезная нагрузка, которая экспрессирует tdTomato в отсутствие Cre, но в Cre-позитивных клетках преобразуется, запуская экспрессию EGFP (Saunders et al., 2012, Front Neural Circuits, 6:47). Когда rAAV2-retro, несущий эту полезную нагрузку, вводили в дорсомедиальный стриатум линии драйвера Cre, специфического в отношении V слоя, Rbp4_KL100 Cre (Gerfen et al., 2013, Neuron, 80: 1368-83), экспрессия EGFP в стриатуме наблюдалась только в этих нейронах слоя V. Кроме того, кортикостриарный путь слоев II и III был четко отличим по экспрессии tdTomato (фиг. 4B). В соответствии с топографической природой кортикостриарной проекции, в результате точно локализованных инъекций вируса в дорсомедиальный стриатум мечеными оказались соответственно небольшие участки коры. Однако во всех случаях мечение также наблюдали в слое V и популяции кортикостриарных слоев II и III (фиг. 4B, нижняя панель), что служит подтверждением того, что два эти два пути из одной и той же области коры проходят внутри стриатума через соседние компартменты матрикса и patch.

Хотя этот эксперимент выявил оба пути, выбор полезной нагрузки «Cre-on» или «Cre-off» позволит получить селективный доступ к одному из них, исключая другой. Следовательно, этот пример подчеркивает дополнительную стратегию в изучении цепи, которая

может быть достигнута путем объединения высокоэффективного ретроградного вируса с доступными линиями драйвера Cre (или Flp).

Пример 17 - Использование rAAV2-retro для изучения цепи и манипуляции генами

Польза rAAV2-retro для изучения цепи будет зависеть от его способности обеспечивать высокий уровень экспрессии генетически кодируемых индикаторов и эффекторов. Способность отслеживать нейронную активность в определенных классах проекционных нейронов была впервые оценена с помощью rAAV2-retro-опосредованной экспрессии GCaMP6f (Chen et al., 2013, *Nature*, 499:295-300) (фиг. 5A-C). Используя *in vivo* двухфотонную Ca²⁺ визуализацию, дендритные и соматические Ca²⁺ импульсы обнаруживали в первичной моторной коре уже через 7 дней после доставки вируса в BPN (Фиг. 5D). Временной профиль сигналов Ca²⁺ отражал структуру задания по контролируемому достижению цели, причем сигнал во многих кортико-понтинных нейронах тесно связан с сигналом «go» (фиг. 5E-F) (Li et al., 2015, *Nature*, 519:51-6). Повторную запись данных из идентифицированных нейронов можно было осуществлять в ходе испытаний как во время сеанса с момента начала экспрессии в зависимости от времени (фиг. 5E, F), так и во время проведения многочисленных поведенческих сеансов в течение более двух месяцев после инфицирования. Таким образом, rAAV2-retro обеспечивает возможность экспрессировать сенсоры в проекционных нейронах на уровнях, достаточных для визуализации, обеспечивая целый ряд новых возможностей для расшифровки участия конкретных проекций в вычислениях цепей.

Наконец, пользу rAAV2-retro оценивали в отношении доставки эффекторов, таких как система редактирования генов CRISPR/Cas9, к проекционным нейронам (фиг. 6). В частности, в rAAV2-retro упаковывали Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9 (Slaymaker et al., 2016, *Science*, 351:84-8)) и отдельную гидовую РНК, предназначенную для уменьшения экспрессии tdTomato. Доставка rAAV2-retro-SaCas9-antitdTomato в BPN животных, экспрессирующих tdTomato в возбуждающих нейронах кортикального слоя V, приводила к подавлению экспрессии tdTomato в 88,6±0,7% нейронов, экспрессирующих SaCas9 в слое V (фиг. 6B, нижняя панель и фиг. 6C, n=3). Напротив,

доставка нецелевого SaCas9 не приводила к каким-либо заметным изменениям, при этом только у $4,4 \pm 3,2\%$ клеток наблюдали потенциальное снижение экспрессии tdTomato (фиг. 6B, верхняя панель и фиг. 6C, $n=3$). Кроме того, экспрессия tdTomato оставалась нетронутой в нейронах слоя V, которые были недоступны через инъекцию в ядро понтинов. Таким образом, система rAAV2-retro позволяет осуществлять эффективную селективную модификацию генов в нейронах, проецирующих в определенные представляющие интерес области.

В совокупности эти наблюдения показывают, что rAAV2-retro является эффективным реагентом для генетически доступных проекционных нейронов для функционального изучения нервных цепей и, в конечном счете, для осуществления терапии.

Пример 18 - Обсуждение

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы могут в значительной степени облегчить функциональное разделение нервных цепей у млекопитающих и являются перспективными для терапевтического вмешательства при расстройствах нервной системы. Направленную эволюцию использовали для обеспечения капсида AAV дополнительной способностью к эффективному ретроградному доступу к проекционным нейронам во многих цепях. Новый сконструированный rAAV2-retro обеспечивает усиление ретроградного транспорта до двух порядков по сравнению с обычно используемыми серотипами AAV, что соответствует эффективности синтетических ретроградных индикаторов во многих цепях. Уровень экспрессии трансгена, достигаемый с помощью rAAV2-retro через ретроградный доступ, является достаточным для изучения функции нервной цепи, а также для целенаправленных манипуляций с геномом нейронов. Таким образом, благодаря возможности избирательного мониторинга и манипулирования проекционными нейронами, соединяющими разные области мозга, инструменты на основе rAAV2-retro способны дать представление о том, каким образом крупномасштабные сети обеспечивают функционирование мозга, и являются перспективными для терапевтического вмешательства при заболеваниях, характеризующихся обширной прогрессирующей дисфункцией сети.

Заметно повышенная эффективность ретроградного доступа, обеспечиваемая rAAV2-retro, по сравнению с его родительским серотипом AAV2, может быть обеспечена за счет опосредованного вставкой разрушения нативного сайта связывания гепарансульфата и/или путем создания новой поверхности связывания, которая включает вставленный пептид. Этот вариант имеет пониженное сродство к гепарину (фиг. 9), что может уменьшить секвестрацию вируса во внеклеточном матриксе синаптической щели и увеличить распространение локального вектора, как это наблюдалось с AAV1 и AAV6. Однако полученное увеличение за счет только распространения вектора не может объяснить эффективность ретроградного транспорта, так как другие вставленные 7-мерные последовательности аналогичным образом нарушают связывание гепарина, но не влияют на ретроградный транспорт. Кроме того, AAV5 и AAV9 не связывают гепарин, однако их ретроградная транспортная эффективность аналогична эффективности AAV2. Альтернативное толкование подтверждается и тем, что пептидные вставки, выбранные в начальном отборе (LAxxDxTKxA (SEQ ID NO:106)/LAxDxTKxxA (SEQ ID NO:107)), имеют одинаковую общую композицию, отличающуюся только консервативным мотивом. Сконструированная пептидная вставка может поддерживать усиленное связывание с существующим клеточным кофактором в пути AAV (например, недавно идентифицированным общим для AAV рецептором), или она может создавать новое взаимодействие с клеточным механизмом – рецептором клеточной поверхности и/или компонентом везикулярного транспорта или пути проникновения в ядро.

Несмотря на улучшение ретроградного транспорта на несколько порядков, обеспечиваемого rAAV2-retro, по сравнению с существующими серотипами, небольшой набор классов проекционных нейронов, по-видимому, является невосприимчивым к эффективной ретроградной инфекции с помощью этого нового варианта rAAV (Таблица 3). Однако следует отметить, что эти проекции также остаются не мечеными и другими серотипами AAV. Является ли уровень экспрессии критического клеточного фактора, который взаимодействует с этим новым вариантом AAV в этих нейронах, просто чрезвычайно низким – заключение, подтвержденное для кортико-таламической и кортико-колликкулярной проекций, например, путем

наблюдения того, что rAAV2-retro все еще способен доставлять достаточное количество рекомбиназы Cre в клеточные тела, обеспечивая высокий уровень экспрессии локально доставляемой Cre-зависимой полезной нагрузки (таблица 3, выделенные записи) – либо этот фактор полностью отсутствует, еще предстоит определить для каждого случая. Дополнительные будущие модификации капсида в этом или других вариантах могли бы обеспечить усиленную ретроградную трансдукцию этих классов нейронов.

Система на основе вектора rAAV2-retro обеспечивает важное дополнение к генетическому набору инструментов для анализа функции нейронных цепей, поскольку получение доступа к отдельным классам проекционных нейронов является критически важным шагом, позволяющим выяснить, каким образом происходит координация динамики локальной цепи и функции крупномасштабной сети. Предполагается, что вычисления локальных цепей зависят в большой степени от динамики всей популяции нейронов в конкретном модуле локальных цепей. Каким образом эта динамика отображается на различные классы проекционных нейронов – и, следовательно, какая информация передается различным нижестоящим целям – остается неразрешенным вопросом для большинства цепей. Векторы на основе rAAV2-retro, отдельно или в комбинации с конкретными трансгенными линиями Cre, обеспечивают генетический доступ к специфическим популяциям проекционных нейронов. В свою очередь, гликопротеин G бешенства, несущий rAAV2-retro, может быть использован для транс-комплемента недавно разработанного нетоксичного условного вектора бешенства для доступа к пресинаптическим микроцепям, воздействующим на определенные классы проекционных нейронов. Приобретенная способность избирательно контролировать и управлять активностью проекционных нейронов отдельных классов и их локальных микроцепей должна дать представление о том, каким образом проекционные нейроны транслируют динамику локальной цепи для своих соответствующих крупномасштабных сетей.

rAAV2-retro также является перспективным для терапевтического вмешательства по нескольким возможным направлениям. Например, в ситуациях, когда патология воздействует на большие объемы нервной ткани – например, болезнь Альцгеймера или болезнь лизосомального

накопления – многократные инъекции являются рискованными с точки зрения безопасности и могут быть недостаточными для достижения необходимых уровней трансдукции. Однако небольшое количество инъекций в стратегических участках может обеспечить распространение вектора на большие объемы (например, в кортико-понтинный тракт – от точки конвергенции в BPN) или труднодоступные ткани (например, спинномозговые двигательные нейроны из мышцы). Кроме того, крупномасштабные функциональные сети вовлечены в распространение многих нейродегенеративных расстройств от места их возникновения. Согласно широко распространенной точке зрения, отложение аномальных агрегатов белков в уязвимых популяциях нейронов вызывает патологический каскад aberrантной активности нейронов внутри и распад крупномасштабных функциональных сетей, в конечном итоге приводя к нарушению неврологических функций. Интересно, что затронутые нейронные сети, по-видимому, способны на ранних стадиях заболевания временно преодолевать aberrантную динамику, так как у пациентов со многими нейродегенеративными заболеваниями часто наблюдаются периоды значительного улучшения. Таким образом, раннее вмешательство, направленное на замедление распространения агрегатов коркового происхождения, вызванных патологией, может быть достаточным для стабилизации или даже восстановления когнитивной функции. С этой точки зрения, субкортикальные проекционные нейроны в мезокортикальных областях, где впервые появляются патологические агрегаты белков, как при болезни Альцгеймера, так и при болезни Паркинсона, представляют собой привлекательную цель для вмешательства. Доступ к этим проекционным нейронам с помощью инструментов, основанных на rAAV2retro, предназначенных, например, для введения мутации, способной остановить дальнейшую агрегацию в cis, или для доставки шаперонов, способных расщеплять агрегаты, может замедлить развитие наиболее изнурительных, когнитивных симптомов. Оценка эффективности и долгосрочной безопасности реагентов rAAV2-retro у приматов, не являющихся людьми, проложит путь к их возможному применению в этих и других подходах генной терапии.

Следует понимать, что, хотя способы и композиции вещества описаны в настоящей заявке в сочетании с рядом различных аспектов,

вышеприведенное описание различных аспектов предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема способов и композиций вещества. В объем приведенной ниже формулы изобретения также входят и другие аспекты, преимущества и модификации.

Раскрыты способы и композиции, которые могут быть использованы, могут быть использованы в комбинации, могут быть использованы для приготовления продуктов, раскрытых способов и композиций или являются такими продуктами, раскрытыми способами и композициями. Эти и другие материалы раскрыты в настоящей заявке, при этом подразумевается, что также раскрыты комбинации, подмножества, взаимодействия, группы и т.д. этих способов и композиций. То есть, хотя конкретная ссылка на каждую из различных отдельных и объединенных комбинаций и перестановки этих композиций и способов не может быть раскрыта в явном виде, каждая из них рассмотрена и описана конкретно в данном описании. Например, если раскрыта и обсуждается конкретная композиция вещества или конкретный способ и ряд композиций или способов, каждая комбинация и перестановка композиций и способов рассматриваются конкретно, если специально не указано иное. Аналогично, любое подмножество или их комбинация также рассмотрены и раскрыты специальным образом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Капсидный белок VP1 аденоассоциированного вируса 2 (AAV2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, 85 или 86, где аминокислотная последовательность встроена между аминокислотами N587 и R588 капсидного белка AAV2 VP1.

2. Капсидный белок AAV2 VP1 по п.1, где капсидный белок дополнительно содержит аминокислотную замену V708I.

3. Капсидный белок AAV2 VP1 по любому из пп. 1-2, дополнительно содержащий одну или более из аминокислотных замен E12V, P29A, H38L, E36G, D41G, L59P, E67A, D69E, K105E, K137E, E147A, G163D, V182E, V182I, Q186R, S207G, N214D, N227D, M235L, F284Y, N335K, N382D, N408S, S423N, S492P, S492Y, N496D, N496Y, N587S, D594N, R585G, T567A или S662C.

4. Капсидный белок AAV2 VP1, содержащий аминокислотную последовательность, включающую последовательность LAxxDxTKxA (SEQ ID NO:106), где аминокислотная последовательность встроена между аминокислотами N587 и R588 капсидного белка AAV2 VP1, и причем капсидный белок AAV2 VP1 содержит аминокислотную замену N382D и V708I.

5. Капсидный белок AAV2 VP1 по п.4 в котором аминокислотная последовательность, встроенная в капсидный белок, содержит последовательность LADQDYTKTA (SEQ ID NO:85).

6. Вирусная частица, содержащая капсидный белок вируса по любому из пп. 1-5.

7. Вирусная частица по п.6 где вирусная частица проявляет повышенное предпочтение к ретроградному движению по сравнению с вирусной частицей дикого типа.

8. Вирусная частица по п.6 где вирусная частица обладает способностью к ретроградному транспорту.

9. Вирусная частица по п.6, дополнительно содержащая полезную нагрузку.

10. Вирусная частица по п.9 в которой полезная нагрузка содержит ген, кодирующий белок, или ингибирующую РНК-нуклеиновую кислоту.

11. Вирусная частица по п.100в которой полезная нагрузка содержит нуклеиновую кислоту - ингибирующую РНК, выбранную из группы, состоящей из антисмыслового олигонуклеотида, миРНК и РНКи.

12. Вирусная частица по п.100в которой полезная нагрузка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую оптический репортер.

13. Вирусная частица по п.100в которой полезная нагрузка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую вирусный белок.

14. Вирусная частица по п.100в которой полезная нагрузка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок.

15. Вирусная частица по п.90в которой полезная нагрузка содержит нуклеиновую кислоту, содержащую промоторную последовательность, функционально связанную с геном, кодирующим белок.

16. Вирусная частица по п.150где промотор представляет собой нейрон-специфический промотор.

17. Вирусная частица по п.150в которой промотор выбран из группы, состоящей из промотора синапсин-1, CMV, GFAP, CAG, CaMKII, MBR, EF1alpha, TRE и mDlx.

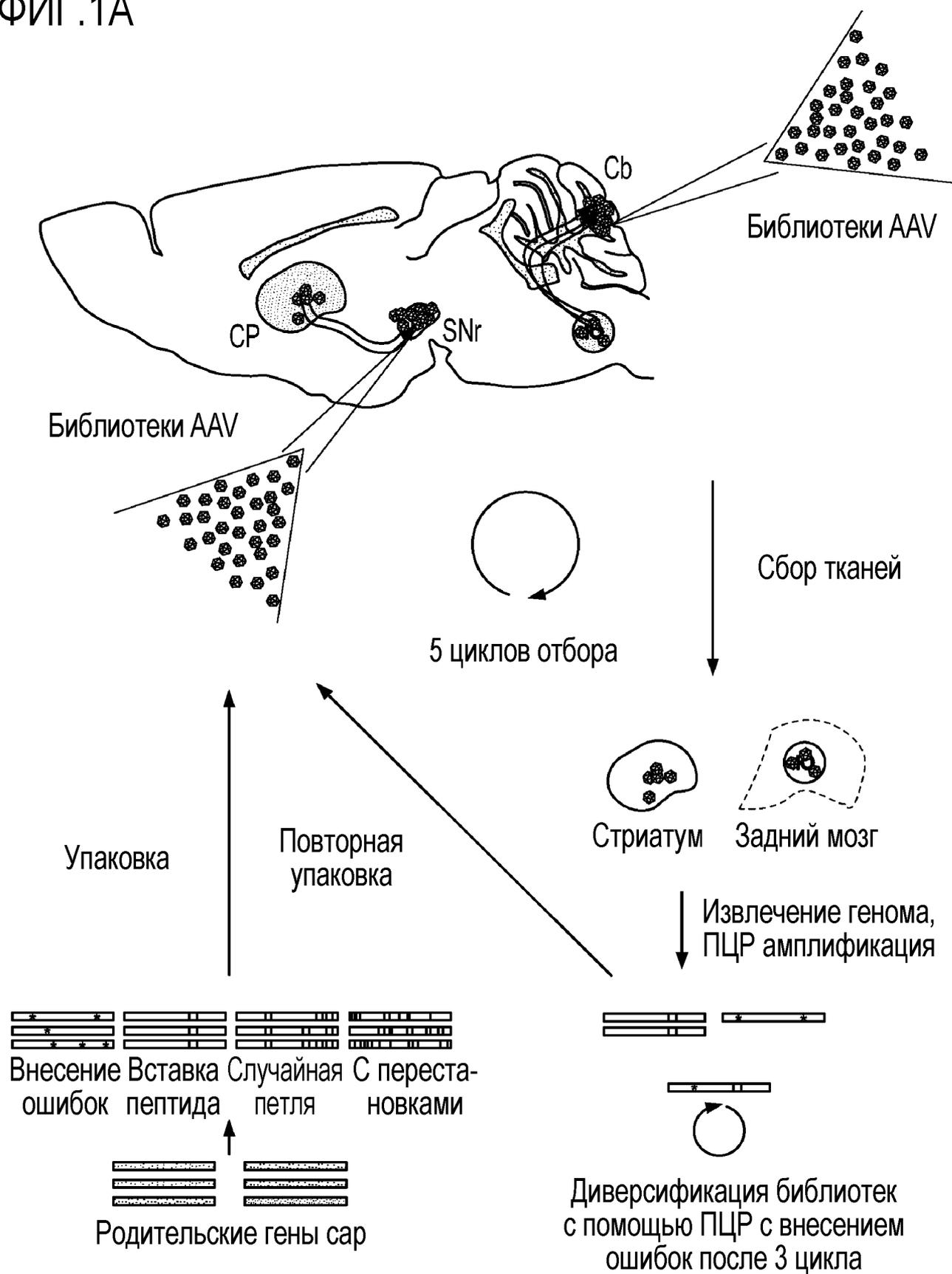
18. Способ доставки полезной нагрузки в один или более нейронов, включающий контактирование одного или более нейронов с вирусной частицей по любому из пп. 6-17, где вирусная частица содержит упакованную в нее полезную нагрузку.

19. Способ лечения нейродегенеративного расстройства, включающий контактирование одного или более нейронов с вирусной частицей по любому из пп. 6-17, где вирусная частица содержит упакованную в нее полезную нагрузку.

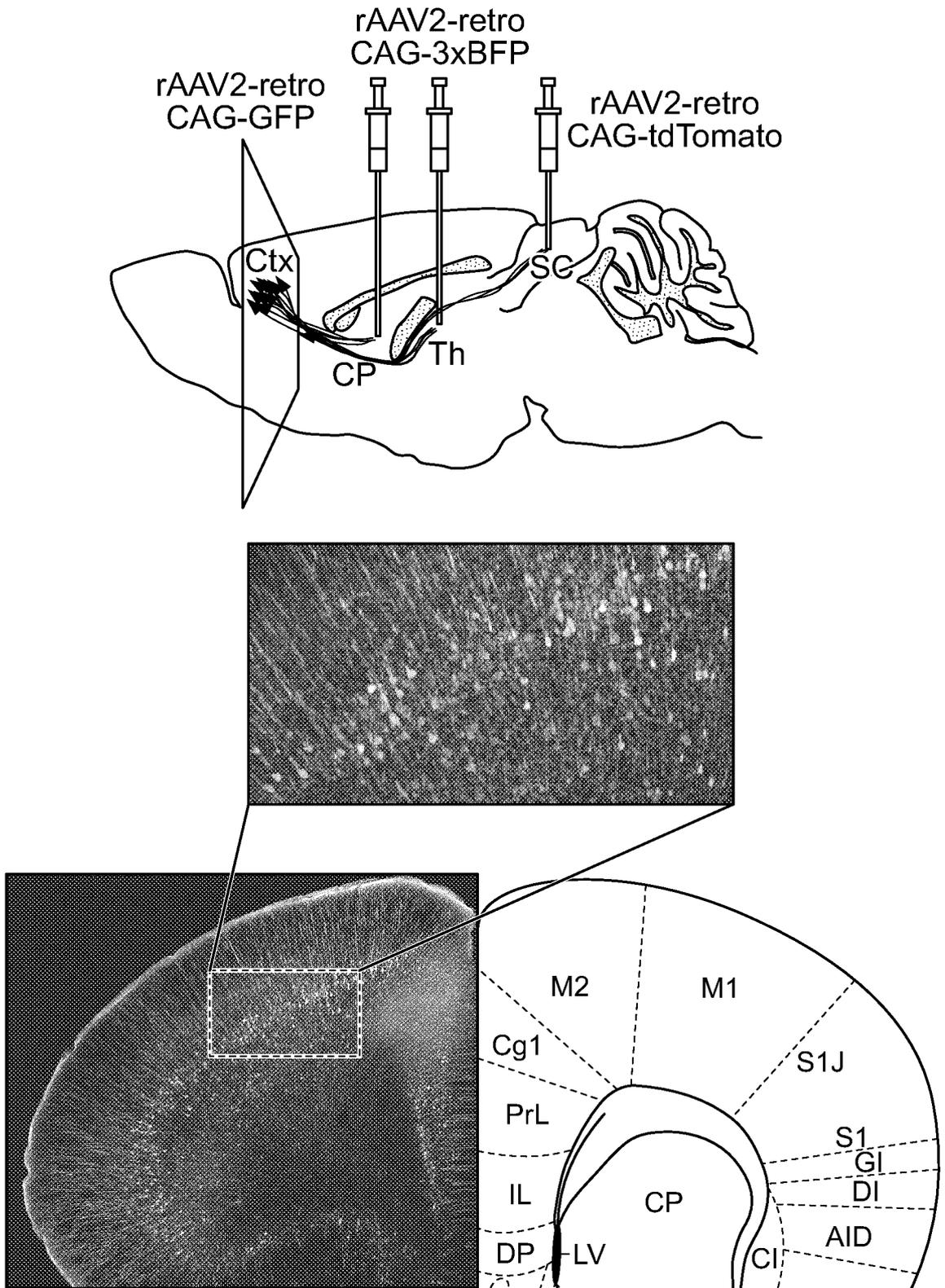
20. Клетка-хозяин, трансдуцированная или инфицированная вирусом или его частью, где вирус или его часть содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок VP1 по любому из пп. 1-5.

По доверенности

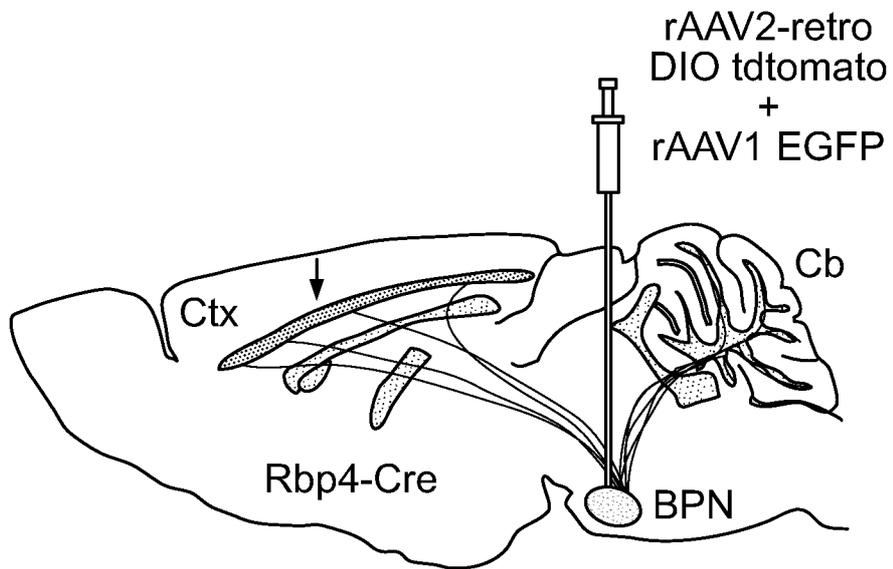
ФИГ.1А



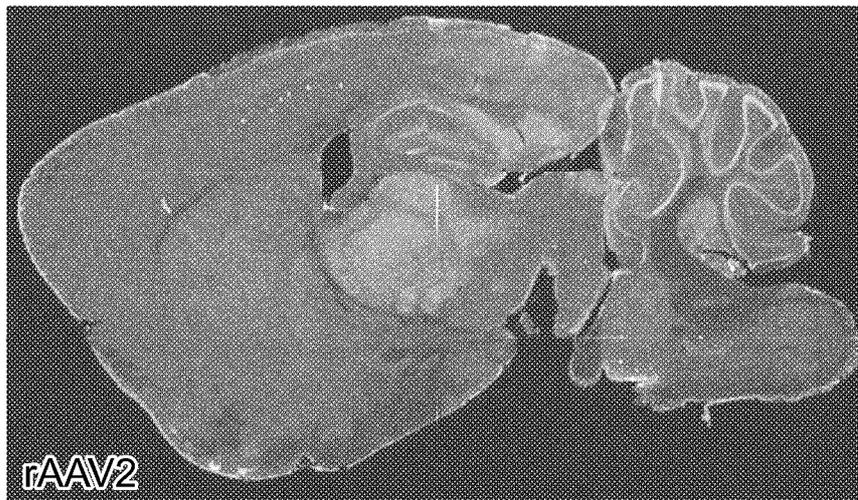
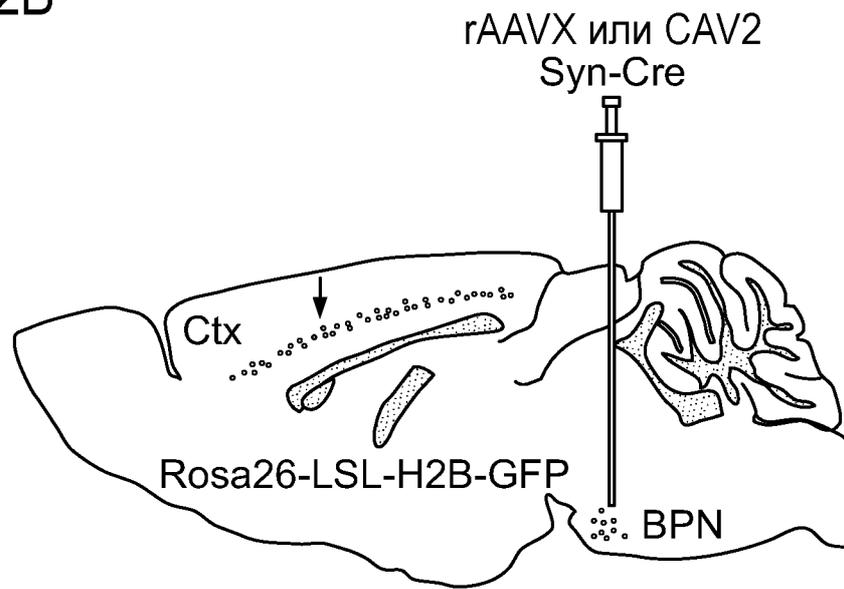
ФИГ.1В



ФИГ.2А



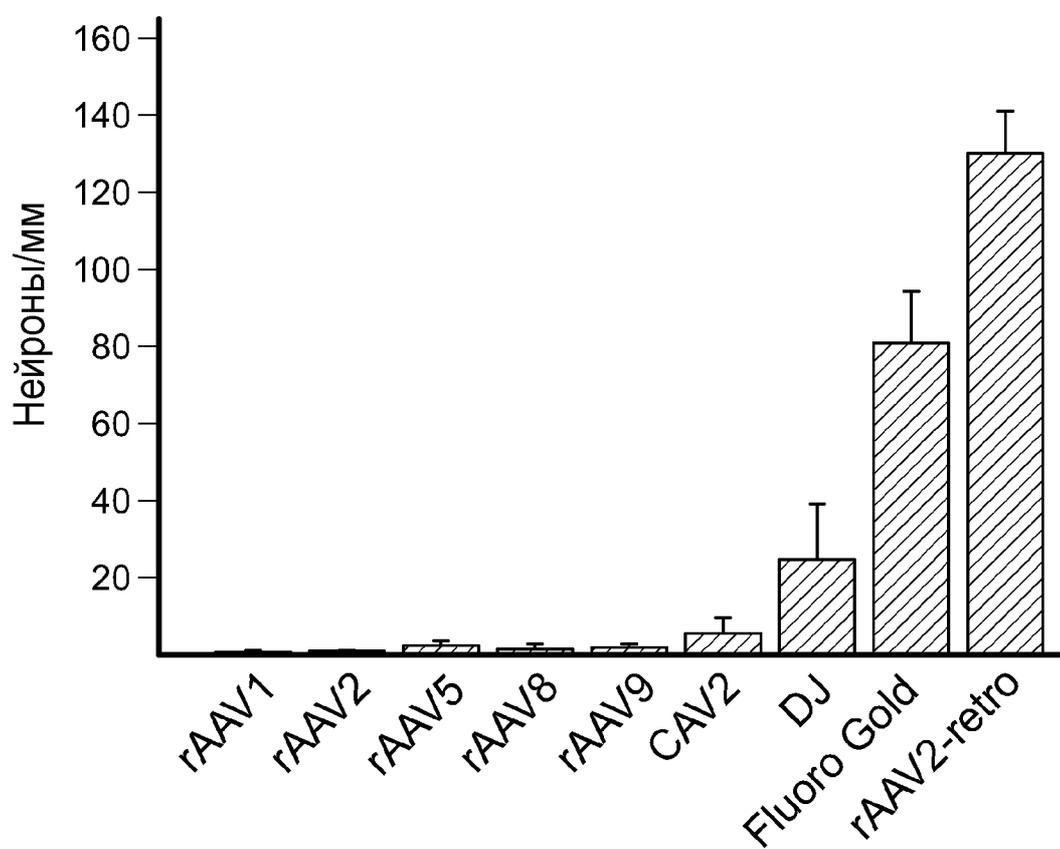
ФИГ.2В



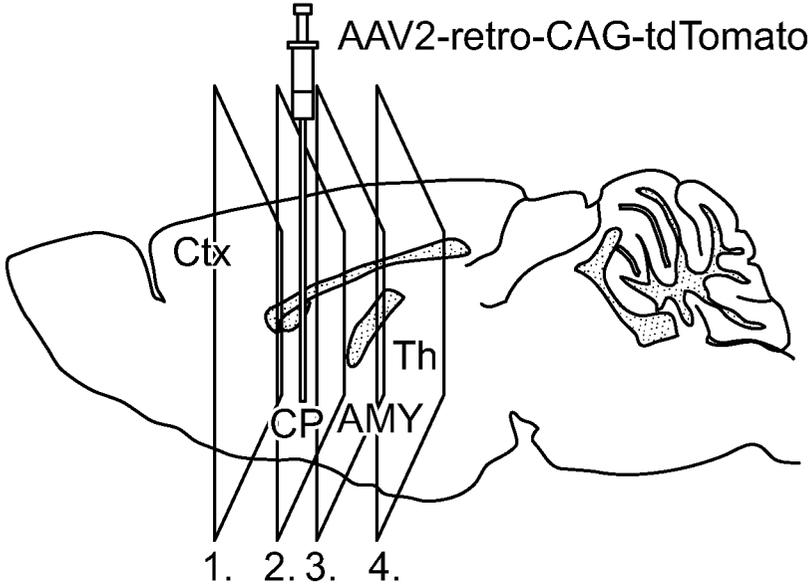
ФИГ.2С



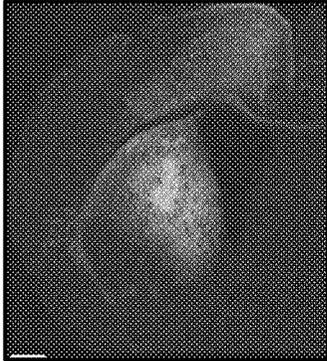
ФИГ.2D



ФИГ.3А



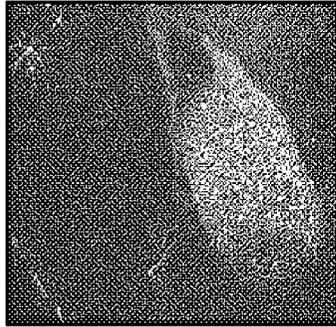
1.



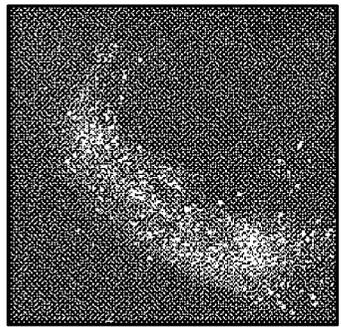
2.



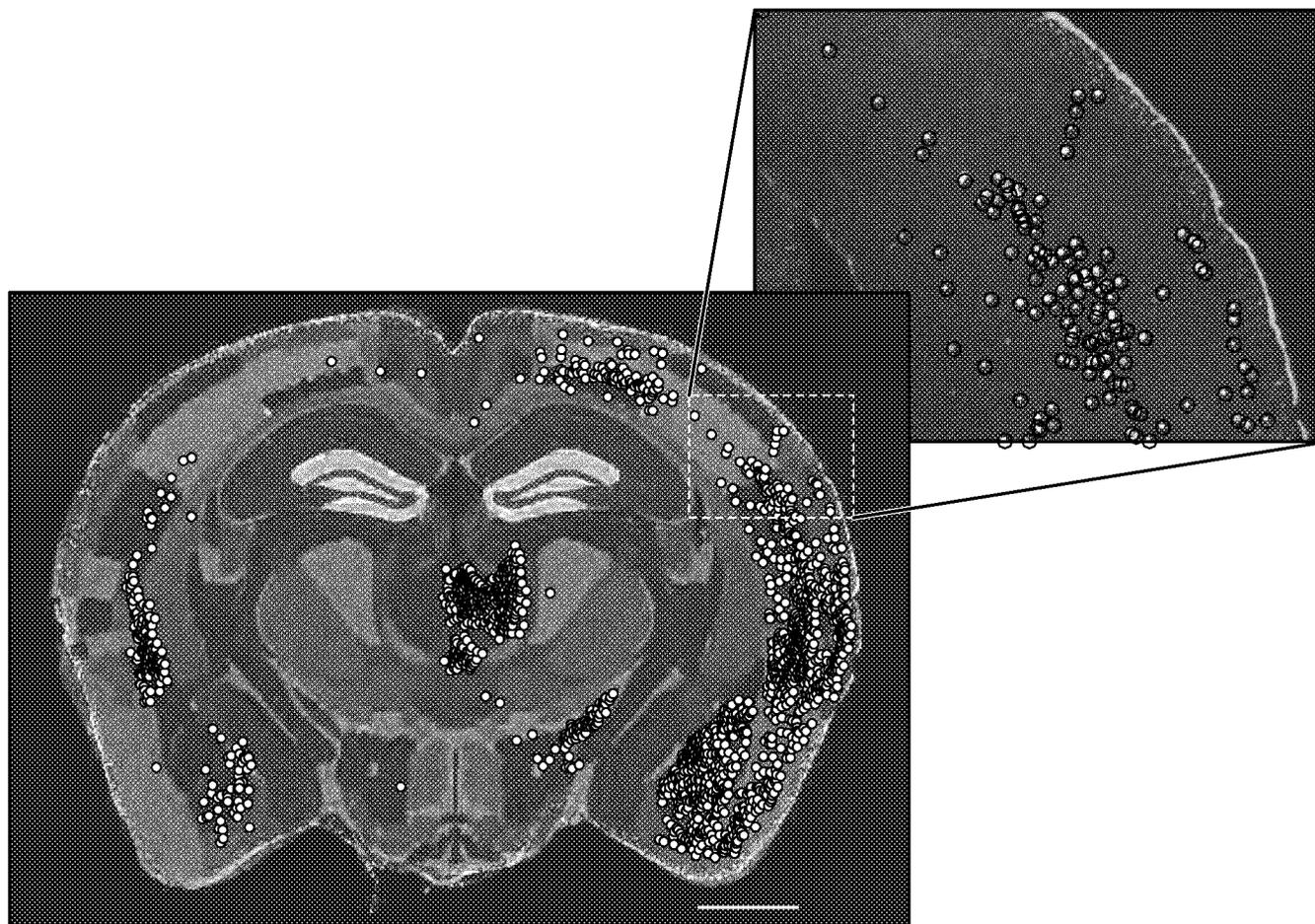
3.



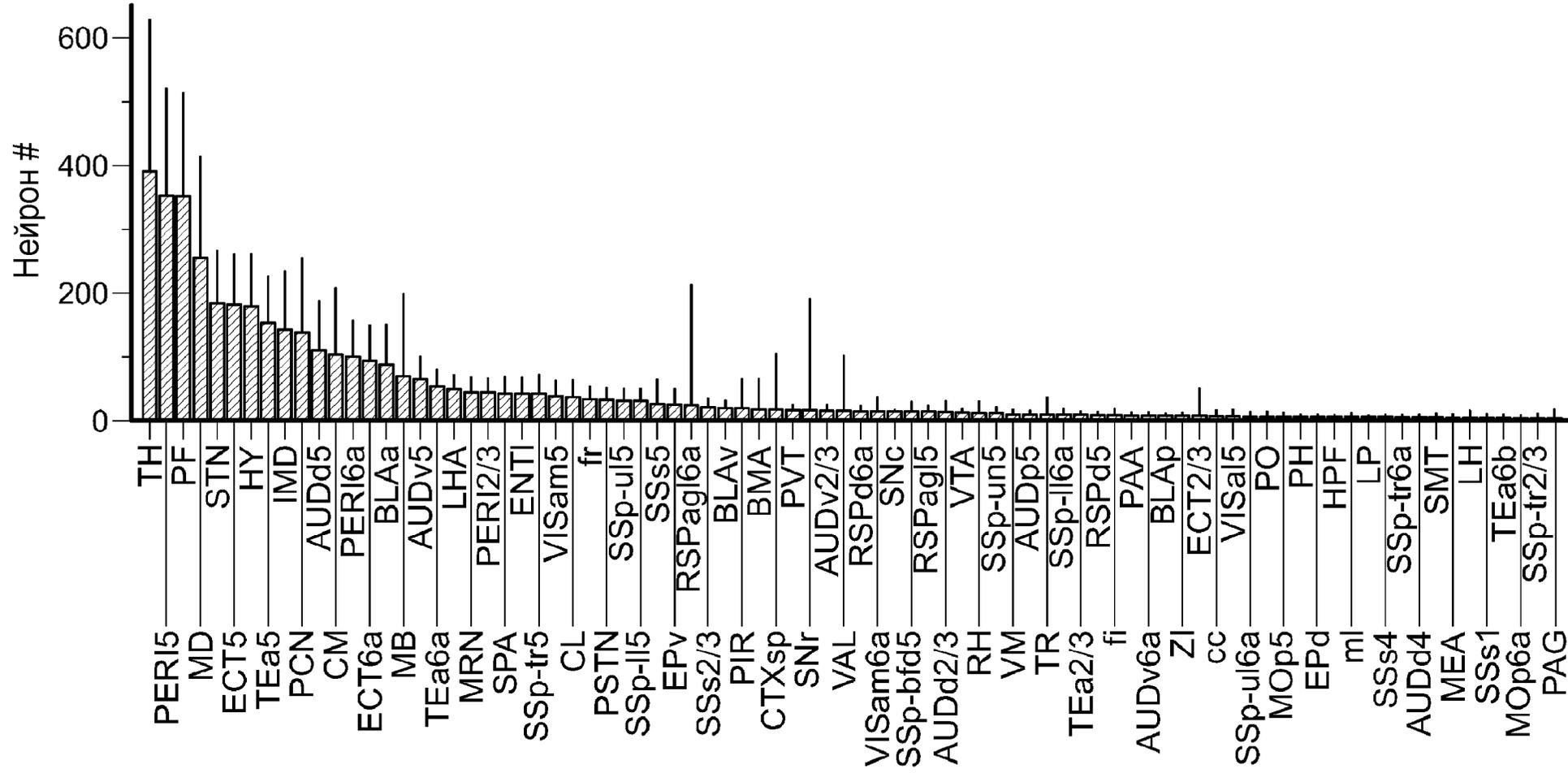
4.



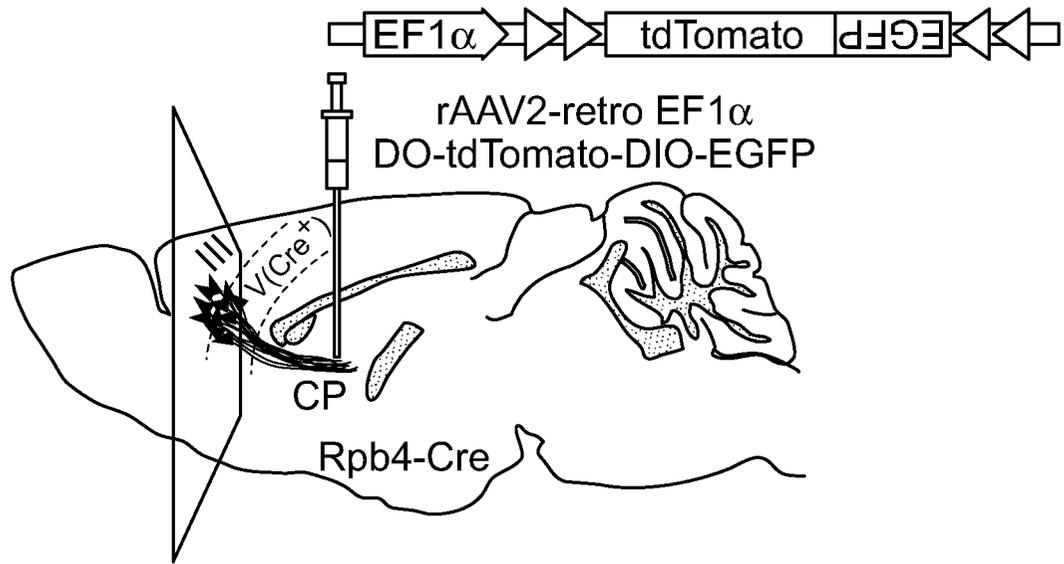
ФИГ.3В



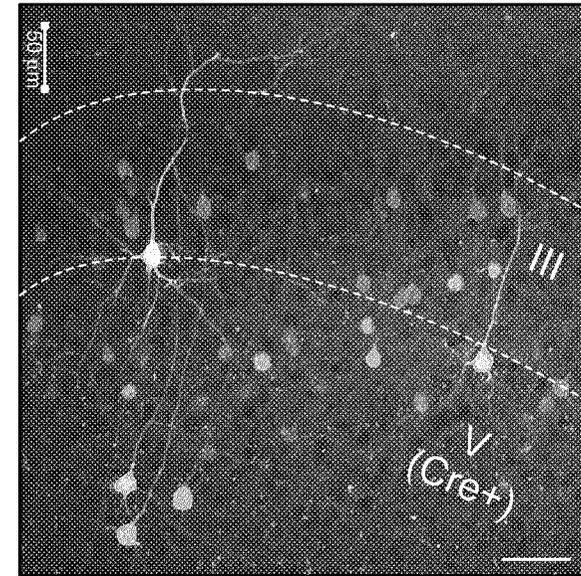
ФИГ.3С



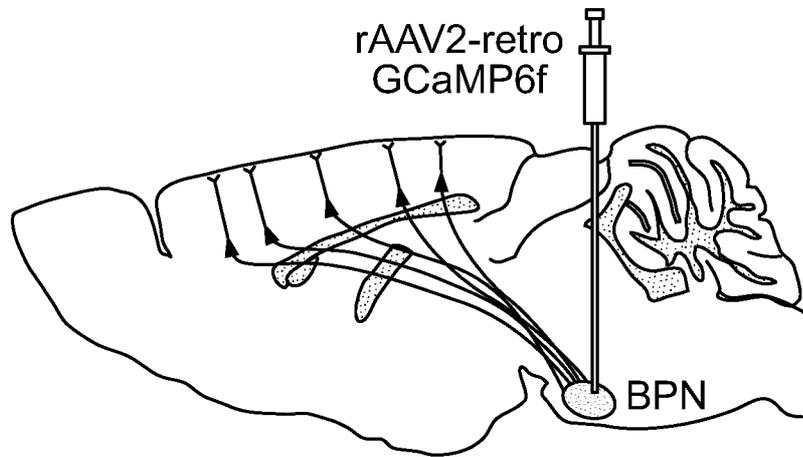
ΦΙΓ.4Α



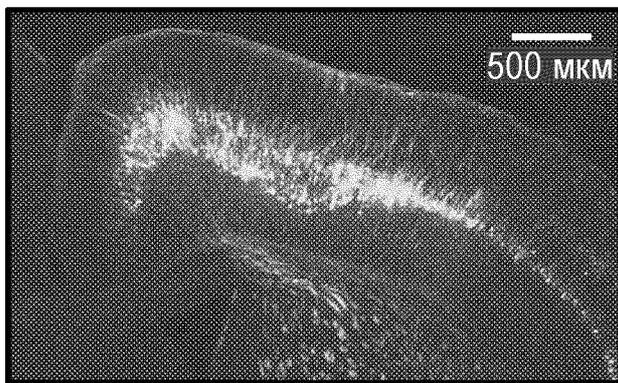
ΦΙΓ.4Β



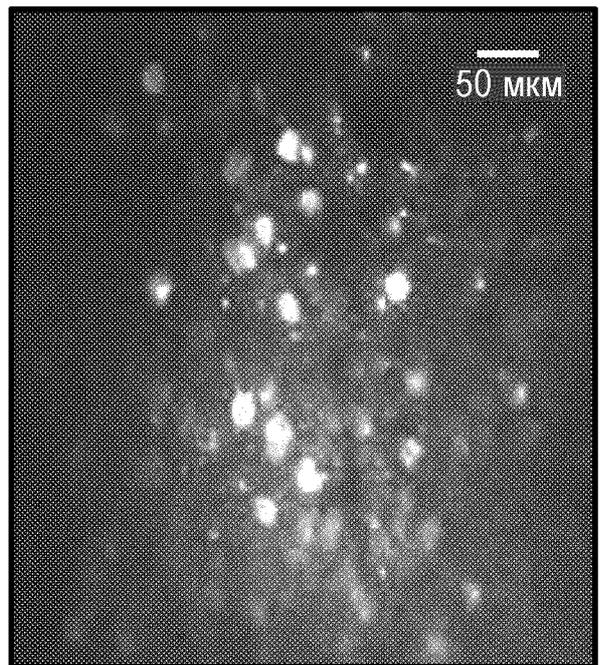
ФИГ.5А



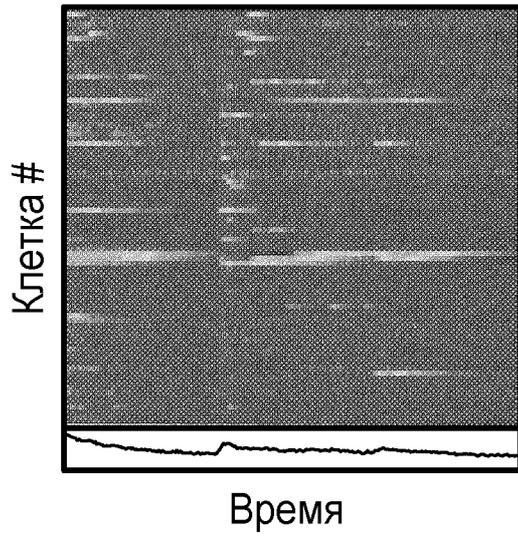
ФИГ.5В



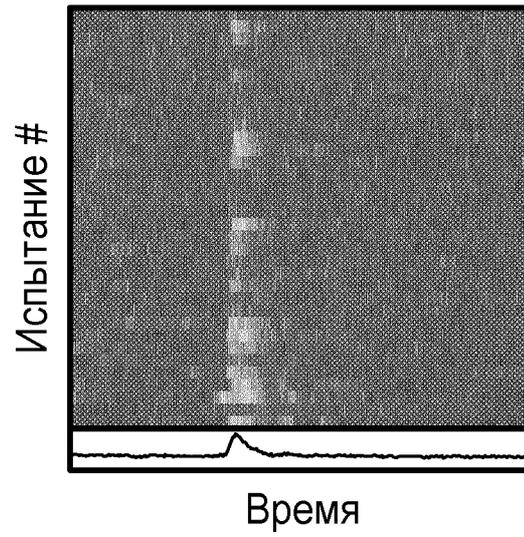
ФИГ.5С



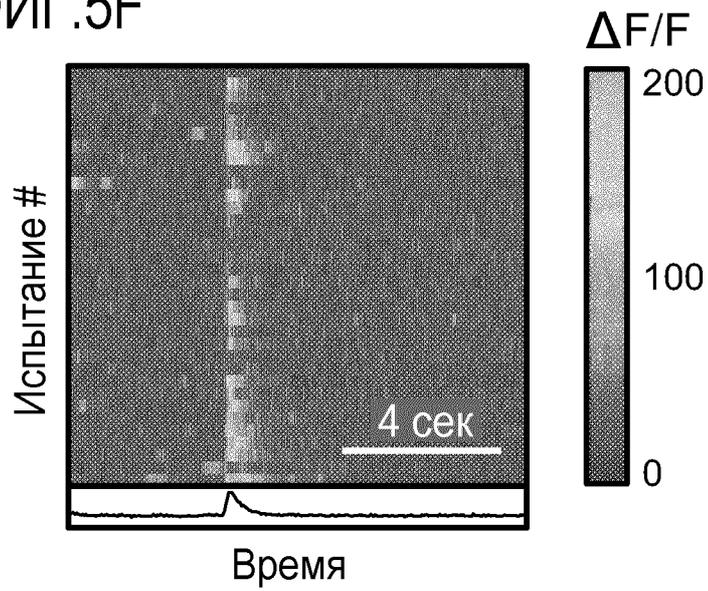
ФИГ.5D



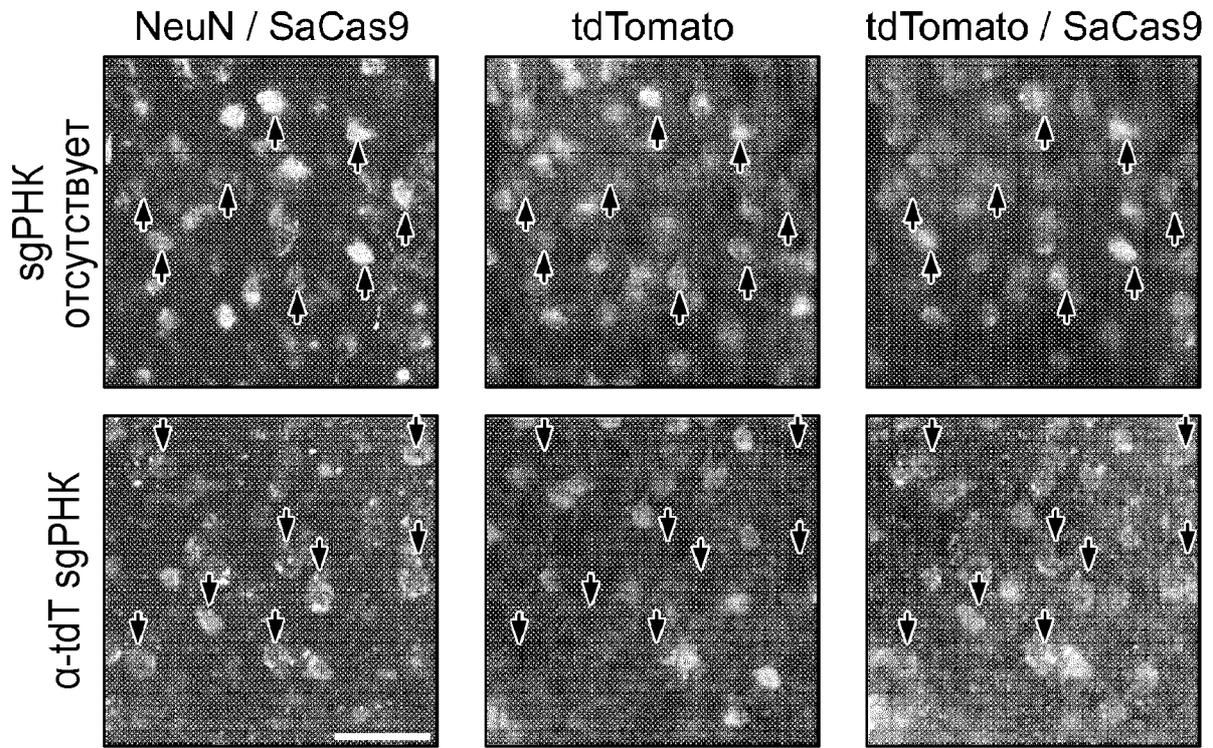
ФИГ.5E



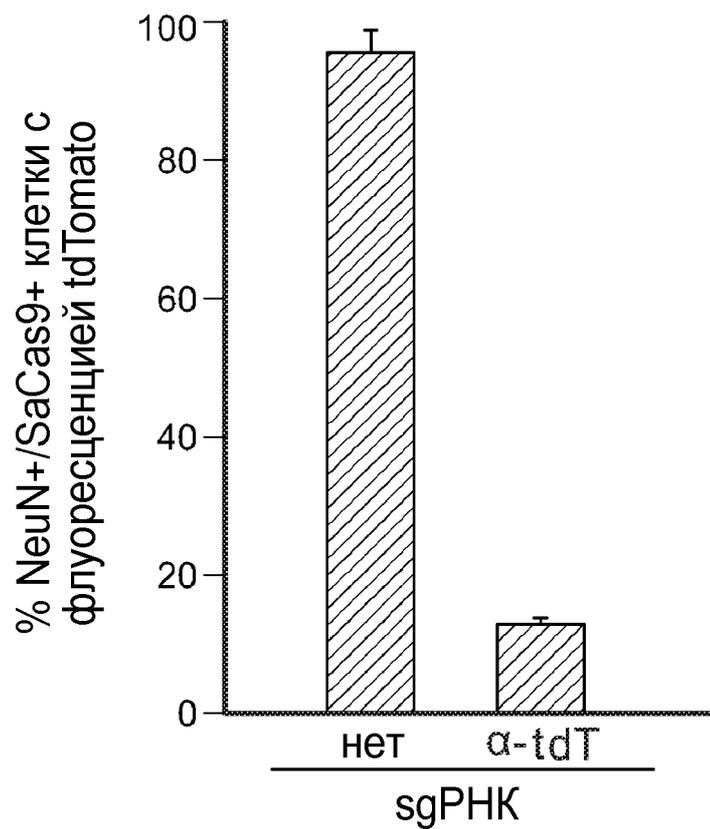
ФИГ.5F



ФИГ.6В

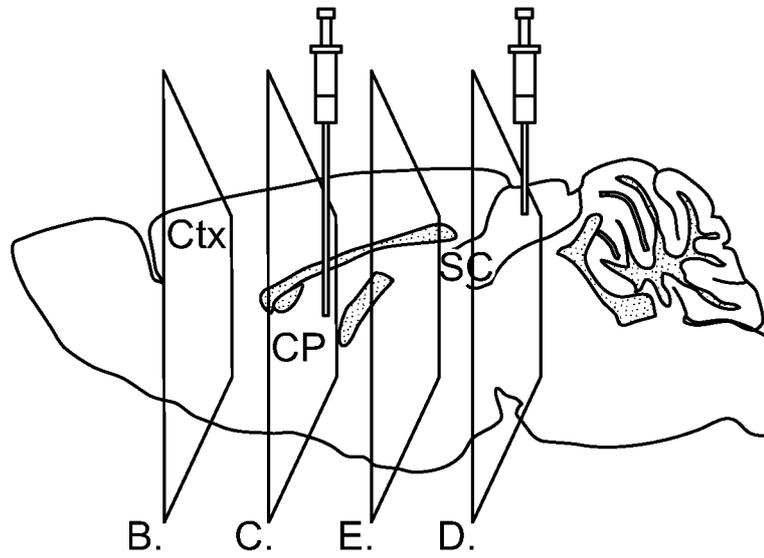


ФИГ.6С

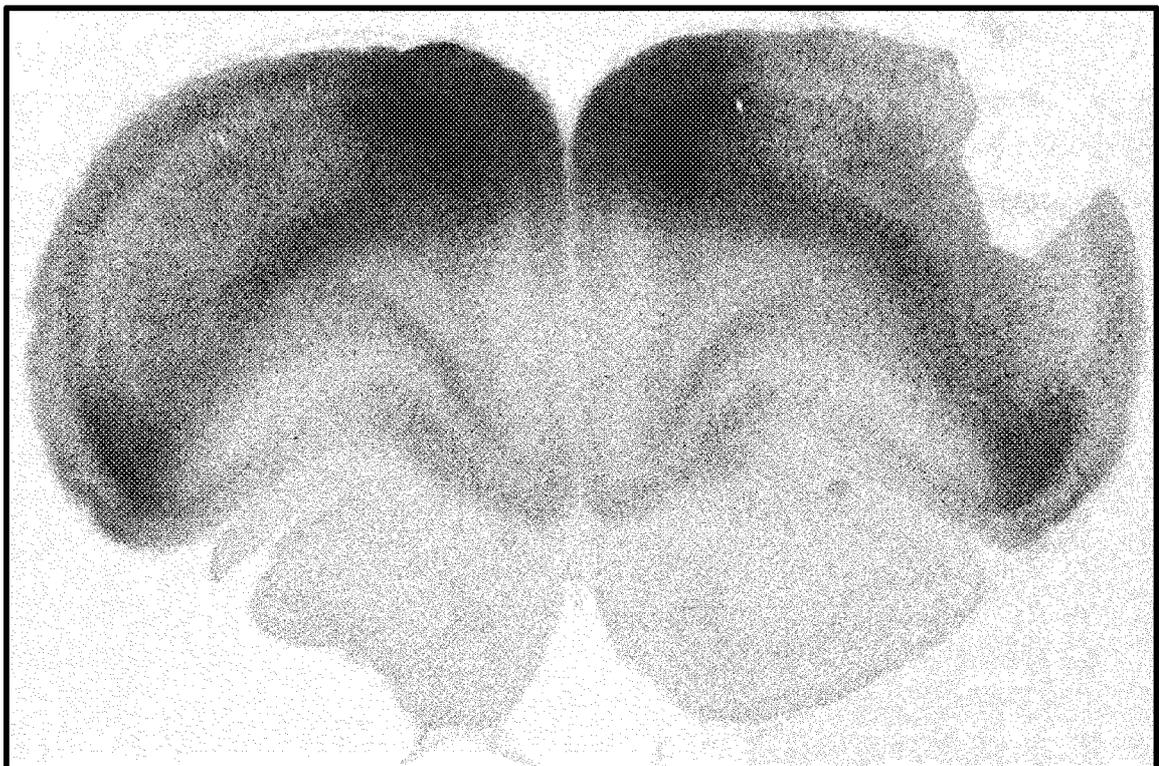


ФИГ.7А

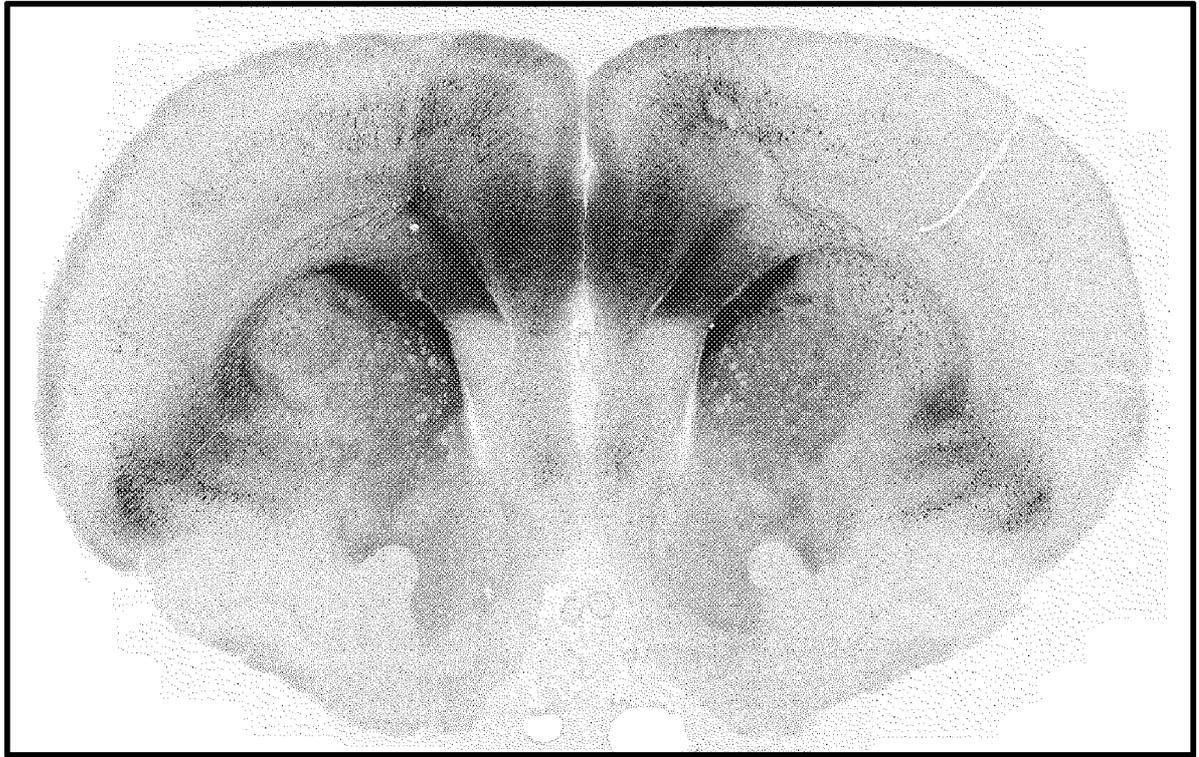
rAAV2-retro-CAG-GFP
rAAV2-retro-CAG-tdTomato



ФИГ.7В



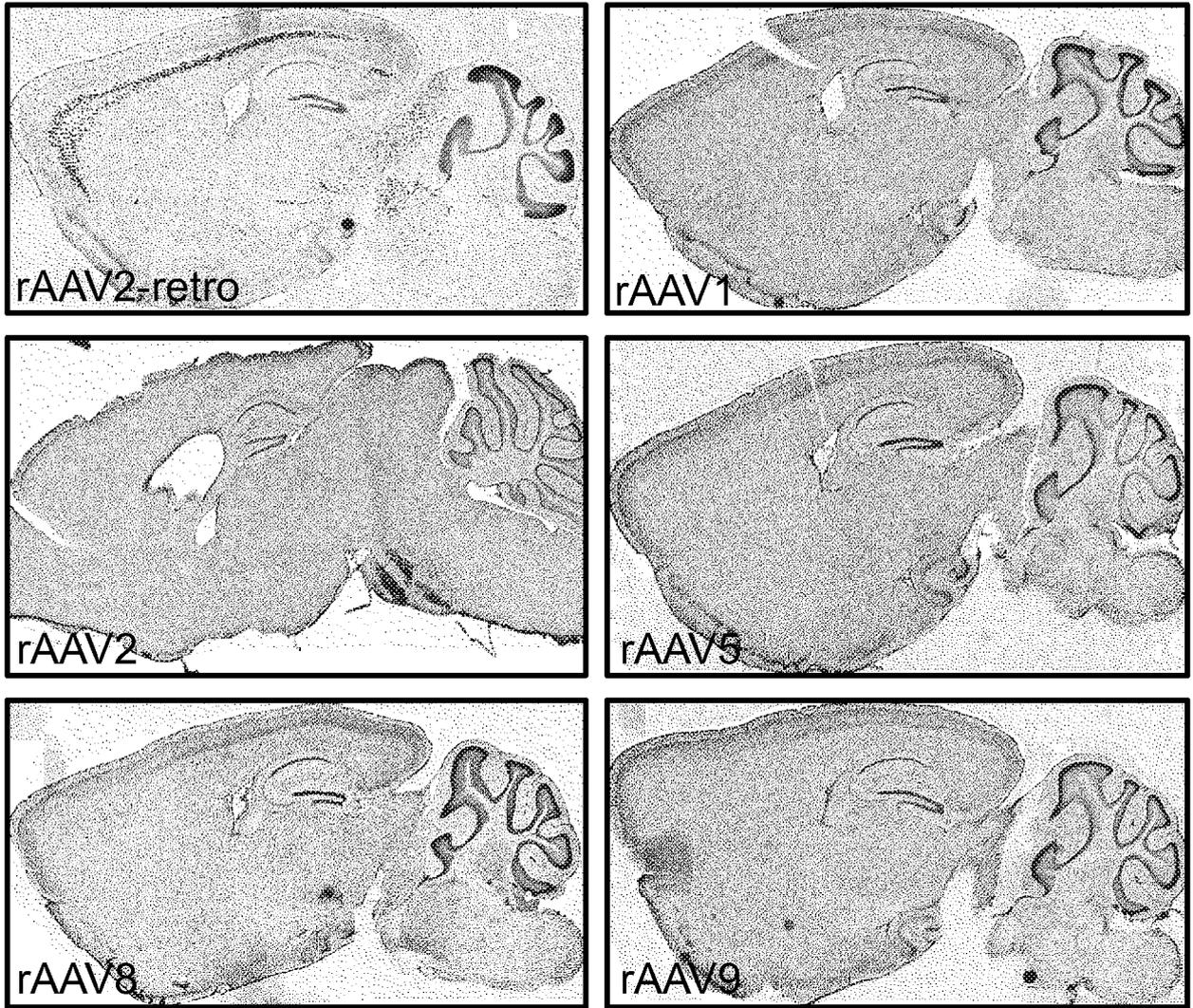
ФИГ.7С



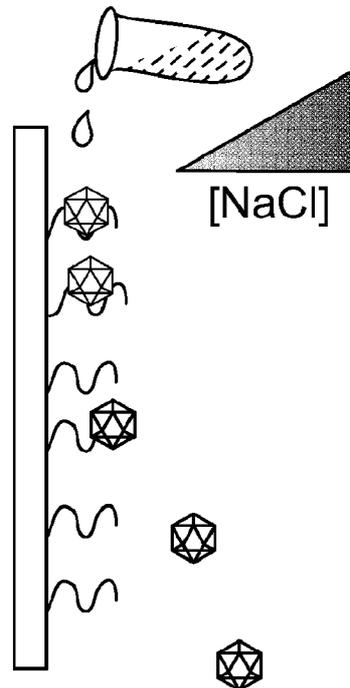
ФИГ.7D



ФИГ.8

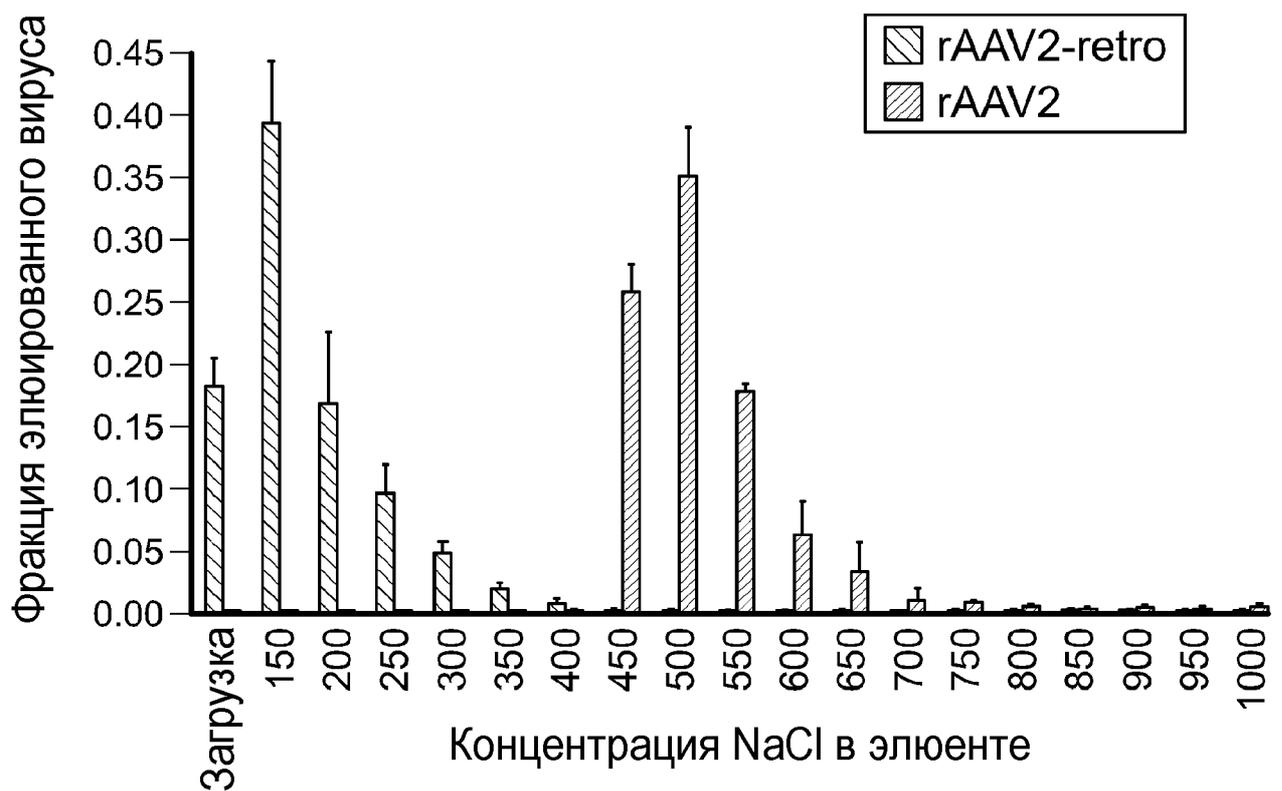


ФИГ.9А



Колонка для аффинной хроматографии с гепарином

ФИГ.9В



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202390885**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07K 14/075, C12N 15/34, 5/10, 7/01, 15/63, A61P 25/00, A61K 48/00Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, EPOQUE Net, Reaxys, Google**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2006/119150 A2 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER et al.) 09.11.2006, страница 1, строки 29-31, страница 2, строки 1-8, страница 3, строки 12-14, страница 4, строки 1-20, примеры, формула	1-20
A	WO 2010/093784 A2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL et al.) 19.08.2010, страница 2, строка 20-страница 3, строка 20, примеры, формула	1-20
A	WO 2016/054554 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 07.04.2016, формула	1-20
A	BUNING Hildegard et al. Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy. Cells Tissues Organs, 2004, 177(3), p. 139-150, страница 146, правый абзац	1-20
A	US 2009/0215879 A1 (UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 27.08.2009, формула	1-20
A	KUGLER S. et al. Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. Gene Therapy, 2003, 10(4), p. 337-347, реферат, страницы 338-342	15-17
A	XU R. et al. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. Gene Therapy, 2001, 8(17), p. 1323-1332, страницы 1324-1326	15-17

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

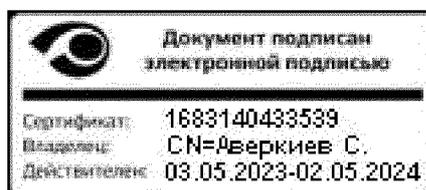
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 14 сентября 2023 (14.09.2023)

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202390885

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C07K 14/075 (2006.01)

C12N 15/34 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)