



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 48/005 (2024.08); A61K 48/0058 (2024.08); C12N 15/864 (2024.08); A01K 2267/0306 (2024.08); C12N 2750/14143 (2024.08); C12N 2800/40 (2024.08); C12N 2830/008 (2024.08); C12N 2830/50 (2024.08); C12N 2830/42 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2023135268, 26.12.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.12.2023

Дата регистрации:
28.01.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.12.2023

(45) Опубликовано: 28.01.2025 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Цурикова Наталья Дмитриевна

(72) Автор(ы):

Корокин Михаил Викторович (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Дейкин Алексей Васильевич (RU),
Корокина Лилия Викторовна (RU),
Пересыпкина Анна Александровна (RU),
Гудырев Олег Сергеевич (RU),
Деев Роман Вадимович (RU),
Кузубова Елена Валерьевна (RU),
Яковлев Иван Антонович (RU),
Исаев Артур Александрович (RU),
Покровский Владимир Михайлович (RU),
Жунусов Никита Сергеевич (RU),
Краюшкина Анастасия Михайловна (RU),
Радченко Александра Игоревна (RU),
Екимова Наталья Викторовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: LOSTAL, W. et al. Efficient recovery
of dysferlin deficiency by dual adeno-associated
vector-mediated gene transfer. Hum Mol Genet,
2010, v. 19, no. 10, p. 1897-907. US 20230279065
A1, 07.09.2023. RU 2527073 C2, 27.08.2014.
PRYADKINA M. et al. A comparison of AAV
strategies distinguishes overlapping vectors for
efficient systemic delivery of the (см. прод.)

(54) Способ повышения физической выносливости в эксперименте на дисферлин-дефицитных мышцах

(57) Реферат:

Изобретение относится к экспериментальной
фармакологии и генетическим технологиям.
Предложен способ повышения физической
выносливости в эксперименте на дисферлин-

дефицитных мышцах. Самцам дисферлин-
дефицитных мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} однократно
вводят двухвекторный препарат на основе
аденоассоциированного вируса 9 серотипа,

содержащий вектор рAAV-Dysf5'-DV, несущий 5'-последовательность кДНК дисферлина, мышцеспецифичный промотор МНСК7, химерный интрон, левый инвертированный концевой повтор (L-ITR) и правый инвертированный концевой повтор (R-ITR); и вектор рAAV-Dysf3'-DV, несущий 3'-

последовательность кДНК дисферлина, L-ITR, PolyA SV40 и R-ITR. Способ приводит к повышению физической выносливости в эксперименте на дисферлин-дефицитных мышцах, что подтверждается результатами теста «Удержание на проволоке» через 3 месяца после введения препарата. 4 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

6.2 kb Dysferlin coding sequence. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 2015, 2, 15009, p. 1-12, doi:10.1038/mtm.2015.9. POTTER R.A. et al. Systemic Delivery of Dysferlin Overlap Vectors Provides Long-Term Gene Expression and Functional Improvement for Dysferlinopathy. *Hum Gene Ther.*, 2018, v. 29, no. 7, p. 749-762. doi: 10.1089/hum.2017.062. GROSE W.E. et al. Homologous Recombination Mediates Functional Recovery of Dysferlin Deficiency following AAV5 Gene Transfer. *PLoS ONE*, 2012, v. 7, Iss. 6, e39233, p. 1-10. ЯКОВЛЕВ И.А. и др. Двухвекторная система на основе аденоассоциированного вируса для генной терапии дисферлинопатии. *Гены & Клетки XVII, N3, Материалы V национального конгресса по регенеративной медицине*, 2022, с. 269-270.

RU 2833672 C1

RU 2833672 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 48/005 (2024.08); *A61K 48/0058* (2024.08); *C12N 15/864* (2024.08); *A01K 2267/0306* (2024.08); *C12N 2750/14143* (2024.08); *C12N 2800/40* (2024.08); *C12N 2830/008* (2024.08); *C12N 2830/50* (2024.08); *C12N 2830/42* (2024.08)

(21)(22) Application: **2023135268, 26.12.2023**

(24) Effective date for property rights:
26.12.2023

Registration date:
28.01.2025

Priority:

(22) Date of filing: **26.12.2023**

(45) Date of publication: **28.01.2025** Bull. № 4

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Tsurikova Natalya Dmitrievna**

(72) Inventor(s):

**Korokin Mikhail Viktorovich (RU),
Pokrovskii Mikhail Vladimirovich (RU),
Deikin Aleksei Vasilevich (RU),
Korokina Liliia Viktorovna (RU),
Peresypkina Anna Aleksandrovna (RU),
Gudyrev Oleg Sergeevich (RU),
Deev Roman Vadimovich (RU),
Kuzubova Elena Valerevna (RU),
Iakovlev Ivan Antonovich (RU),
Isaev Artur Aleksandrovich (RU),
Pokrovskii Vladimir Mikhailovich (RU),
Zhunusov Nikita Sergeevich (RU),
Kraiushkina Anastasiia Mikhailovna (RU),
Radchenko Aleksandra Igorevna (RU),
Ekimova Natalia Viktorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR INCREASING PHYSICAL ENDURANCE IN EXPERIMENT ON DYSFERLIN-DEFICIENT MICE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmacology.

SUBSTANCE: invention relates to experimental pharmacology and genetic technologies. Disclosed is a method for increasing physical endurance in experiment on dysferlin-deficient mice. Male dysferlin-deficient mice B6.A/J-Dysf^{prmd} single introduction of a two-vector preparation based on adeno-associated virus of serotype 9 containing a vector pAAV-Dysf5'-DV, bearing 5'-sequence of dysferlin cDNA, muscle-

specific promoter MHCK7, chimeric intron, left inverted terminal repeat (L-ITR) and right inverted terminal repeat (R-ITR); and vector pAAV-Dysf3'-DV, bearing 3'-sequence of dysferlin cDNA, L-ITR, PolyA SV40 and R-ITR.

EFFECT: method leads to increased physical endurance in experiment on dysferlin-deficient mice, which is confirmed by results of test "retention on wire" in 3 months after introduction of the preparation.

1 cl, 4 tbl, 1 ex

RU 2 833 672 C1

RU 2 833 672 C1

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии и генетическим технологиям.

По известным литературным данным, мутации в гене *DYSF* в хромосоме 2p13 человека являются причиной дисферлинопатий. Дисферлинопатия включает в себя пресимптоматический этап бессимптомного повышения уровня креатинкиназы в крови и манифестный этап, характеризующийся прогрессирующим поражением проксимальных и/или дистальных мышц конечностей [Contreras-Cubas, C., Barajas-Olmos, F., Frayre-Martínez, M.I., Siordia-Reyes, G., Guízar-Sánchez, C.C., García-Ortiz, H., Orozco, L., & Baca, V. (2022). Dysferlinopathy misdiagnosed with juvenile polymyositis in the pre-symptomatic stage of hyperCKemia: a case report and literature review. BMC medical genomics, 15 (1), 139]. Мыши сублинии B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ (Bla/J) являются репрезентативной моделью дисферлинопатии и могут быть использованы для оценки новых терапевтических средств для лечения данного заболевания [М.В. Корокин, Е.В. Кузубова, А.И. Радченко и др. Мыши B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ как генетическая модель дисферлинопатии. Фармация и фармакология. 2022; 10 (5): 483-496]. Как было показано ранее, генная терапия с использованием рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV) хорошо переносится и безопасна [Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., 3rd, & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy, 31(4), 317-334].

Известен способ терапии дисферлинопатий с применением кодон-оптимизированной кДНК, кодирующей дисферлин человека (патент на изобретение RU 2527073, опублик. 27.08.2014), включающий введение фармацевтической композиции для восстановления нарушенной экспрессии и/или функции белка дисферлина в скелетной мышце, содержащая аденовирус, человеку (или животным) таким способом и в таком количестве, которые обеспечат лечебный эффект в зависимости от нозологической формы и медицинских показаний. Фармацевтическая композиция может вводиться внутримышечно - местно, системно - внутривенно, аэрозольно, в виде генно-клеточной трансплантации или трансфузии после *in vitro* обработки различных аутологических клеток, например гемопоэтических и их более дифференцированных производных, мезенхимальных, сосудисто-стромальной фракции, мезангиобластов и др.

Основным недостатком способа является то, что аденовирус обладает более высокой иммуногенностью по сравнению с AAV. Преимущество использования рекомбинантного AAV в генной терапии можно объяснить отсутствием патогенности и дополнительной безопасностью из-за дефектности его репликации и способности опосредовать более долгосрочную экспрессию в различных тканях, чем у рекомбинантного аденовируса [Lai, C.M., Lai, Y.K., & Rakoczy, P.E. (2002). Adenovirus and adeno-associated virus vectors. DNA and cell biology, 21 (12), 895-913]. Помимо этого, в данном способе не приведены режимы введения и дозы препарата при конкретных показаниях.

Наиболее близким по существу предлагаемого изобретения является способ терапии дисферлинопатий [Lostal, W. et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. Hum Mol Genet, 2010. 19 (10): p. 1897-907]. Авторы клонировали кДНК дисферлина в вектор на основе AAV. Так как кДНК дисферлина превышает размер трансгенной вставки, которую способен нести геном AAV, кДНК гена *DYSF* клонировали в виде 2 частей в два независимых AAV вектора: один рекомбинантный AAV несет 5' конец кДНК вместе с донорным сайтом сплайсинга интрона, другой рекомбинантный AAV несет акцепторный сайт сплайсинга и следующий за ним 3' концевую последовательность кДНК. В результате естественной способности AAV к конкатемеризации происходило объединение двух частей кДНК и экспрессия

полноразмерного белка дисферлина. Системная инъекция в хвостовую вену самцов дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} этих двух векторов приводила к системной, хотя и слабой, экспрессии белка. Инъекции приводили к улучшению гистологической картины мышечной ткани, сокращению числа некротических волокон, восстановлению репарации мембраны и глобальному улучшению двигательных функций.

Недостатком данного способа является слабая экспрессия белка дисферлина при введении двух рекомбинантных AAV.

Задачей настоящего изобретения является создание эффективного способа повышения физической выносливости с использованием генно-инженерной конструкции на основе AAV, экспрессирующей дисферлин человека.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ повышения физической выносливости в эксперименте на дисферлин-дефицитных мышах, лишенный недостатка аналога, а именно высокой иммуногенности аденовируса, с приведением доз и режима введения AAV9-ДИСФ-ДВ в эксперименте, и недостатка прототипа, а именно слабой экспрессии дисферлина при введении двух рекомбинантных AAV, за счет применения мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном для усиления экспрессии дисферлина.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ повышения физической выносливости в эксперименте на дисферлин-дефицитных мышах, включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} и однократное введение двувекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса, причем вводят внутримышечно (в/м) AAV9-ДИСФ-ДВ на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, содержащий вектор pAAV-Dysf5'-DV, несущий 5'-последовательность дисферлина, мышцеспецифичный промотор МНСК7 с SEQ ID NO: 2, химерный интрон с SEQ ID NO: 1, левый инвертированный концевой повтор (L-ITR) с SEQ ID NO: 3 и правый инвертированный концевой повтор (R-ITR) с SEQ ID NO: 4; и вектор pAAV-Dysf3'-DV, несущий 3'-последовательность дисферлина, L-ITR с SEQ ID NO: 3, PolyA SV40 с SEQ ID NO: 5 и R-ITR с SEQ ID NO: 4, в дозе 5×10^{12} ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis (на животное суммарно 300 мкл) мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} в возрасте 6 месяцев с оценкой физической выносливости через 3 месяца после введения AAV9-ДИСФ-ДВ, подтверждаемый результатами теста «Удержание на проволоке».

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что однократное в/м введение AAV9-ДИСФ-ДВ в дозе 5×10^{12} ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} в возрасте 6 месяцев приводит к повышению физической выносливости у дисферлин-дефицитных мышей, что подтверждается достоверным увеличением времени удержания на проволоке мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} с введением AAV9-ДИСФ-ДВ, на 94,0% ($p < 0,01$), по сравнению с нелечеными животными в тесте «Удержание на проволоке», так как двойные AAV векторы имеют перекрывающуюся область размером 1 т.п.н., которая служит субстратом для рекомбинации с целью создания полноразмерной кДНК дисферлина и более выраженной экспрессии полноразмерного белка дисферлина за счет наличия химерного интрона в 5'-кассете.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ AAV9-ДИСФ-ДВ

Пример 1

Этап 1. Был произведен дизайн и синтез олигонуклеотидов, кодирующих химерный интрон, представлено в таблице 1.

Таблица 1

5

Химе рный интрон (CI)	gtaagtatcaaggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgggcttgctgaga cagagaagactcttgcgttctgataggcacctattggtcttactgacatccactttgcctttctctcca cag (SEQ ID NO: 1)
-----------------------------	---

10

Этап 2. 5' последовательность дисферлина была клонирована в вектор для сборки AAV (pAAV-Dysf5'-DV), при этом вектор несет следующие регуляторные последовательности, представлено в таблице 2.

15

Таблица 2

20

25

30

35

40

45

Наименование характеристик и	Целевое значение
Регуляторная последовательность (промотор МНСК7)	<p>ctagaagetgcatgtctaagetagaccctcagattaaaaataactgaggttaagggc ctgggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctctctatctgcccatcgcccttgg ggaggaggaatgtgccaaggactaaaaaaggccatggagccagagggcgagggca acagaccttcatgggcaaaccttggggccctgctgtctagcatgccccactacgggttag gctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacaccgagatgectggtataattaacca gacatgtggctgcccccccccccccaacacctgctgcctctaaaaataacctgtccctggt ggatcccctgcatgcaagatcttgaacaaggctgtgggggactgagggcaggetgtaac aggcttgggggcccagggcttatacgtgectgggactcccaaagtattactgttccatgttccc ggcgaagggccagctgtccccgccagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagc aagtcagccccttggggcagcccatacaaggccatggggctgggcaagctgcacgcctggg tccgggtgggacgggtgccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcaggggcccc tcctggggacagcccctctggctagtcacacctgtaggetcctctatataaccaggggg cacaggggctgeectcattctaccaccctccacagcagagct (SEQ ID NO: 2)</p>
Химерный интрон (CI)	<p>gtaaglateaaggttacaagacagggttaaggagaccaatagaaactgggcttgc gagacagagaagactcttgcgtttctgataggcacctattgggttactgacatccacttgcct ttctctccacag (SEQ ID NO: 1)</p>
Левый инвертированный концевой повтор (L-ITR)	<p>cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccccgggctcggggc gaccttggctgccccggcctcagtgagcgcgagcgcgcagagagggagtgccaact ccateactaggggttct (SEQ ID NO: 3)</p>
Правый инвертированный концевой повтор (R-ITR)	<p>aggaaccctagtgatggagttggccactcccctctctgcgcgctcgtcgtcact gaggccgggcgaccaaaggtgcgccgacgccccgggcttgcggggcgccctcagtgag cgagcgcgagcgcgcagctgectgcagg (SEQ ID NO: 4)</p>

Этап 3. 3' последовательность дисферлина была клонирована в вектор для сборки AAV (pAAV-Dysf3'-DV), при этом вектор несет следующие регуляторные последовательности, представлено в таблице 3.

Таблица 3

Наименование характеристики	Целевое значение
Левый инвертированный концевой повтор (L-ITR)	cctgcaggcagctgcgcgctcgcctcactgagggcccccgggctcggg cgaccttggctgccccggcctcagtgagcgagcgagcgagcgagagaggagtgccca actccatcactaggggttct (SEQ ID NO: 3)
Сигнал полиаденилирования SV40 (PolyA SV40)	taagatacattgatgagttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatg ctctattgtgaaattgtgatgctattgtcctatttgaaccattataagctgcaataaacaagt t (SEQ ID NO: 5)
Правый инвертированный концевой повтор (R-ITR)	aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgcctcactc ctgaggccggggcgaccaaaggctgccccgacgccccgggcttccccgggctcag tgagcgagcgagcgagcgagcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 4)

Этап 4. Была проведена проверка последовательностей плазмид pAAV-Dysf5'-DV и pAAV-Dysf3'-DV секвенированием (только клонированные последовательности, не включая ITR).

Для сборки пробной партии вирусов были в препаративных количествах получены 4 плазмиды: AAV9-Dysf5'-DV, AAV9-Dysf3'-DV, pAAV-RC2/9 и pHelper.

Методом тройной транзientной трансфекции в клетках HEK293T были получены пробные партии вирусов AAV9-Dysf5'-DV и AAV9-Dysf3'-DV. Вирусные препараты были очищены по отработанной ранее в лаборатории методике от клеточного дебриса, примесных белков и пустых вирусных капсидов. Вирусный препарат стерилизовали через спин-колонки с размером пор 0,22 мкм и замораживали в буфере для хранения вирусных препаратов: 1x PBS, 350 mM NaCl, 0,001% Pluronic F68 в пробирках типа эппендорф по 0,5 мл. Аликвоты вирусных препаратов отбирали перед замораживанием для контроля качества.

Качество полученных вирусов AAV9-Dysf5'-DV и AAV9-Dysf3'-DV определяли окрашиванием в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Концентрацию вирусов определяли количественной ПЦР в реальном времени с использованием зондов и праймеров к инвертированным повторам по отработанной ранее в лаборатории методике. Титр вирусных частиц в конечном препарате составляет 2,15E+13 гк/мл для AAV9-Dysf5'-DV и 2,06E+13 гк/мл для AAV9-Dysf3'-DV соответственно.

В ходе работ были получены 2 плазмидные конструкции, кодирующие кДНК дисферлина pAAV-Dysf5'-DV и pAAV-DysD'-DV. Последовательности полученных плазмид были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Полученные плазмиды были трансформированы в штамм Top 10 E.coli для выделения.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ААВ9-ДИСФ-ДВ

Эксперименты проведены на 34 мышах-самцах сублинии B6.A/J-Dysf^{prmd} массой 27-33 г в возрасте 6 месяцев, полученных из испытательного центра «Виварно-экспериментальный комплекс ООО «НИИ Митоинженерии МГУ». Ранее на мышах сублинии B6.A/J-Dysf^{prmd} было показано, что к 6 месяцам жизни у данных мышей симптоматика дисферлинопатии прогрессирует и более выражена, чем в 3 месяца, в связи с чем в эксперимент были взяты мыши в возрасте 6 месяцев [Кузубова Е.В., Радченко А.И., Краюшкина А.М. и др. (2023). Анализ модели миодистрофии Миоши в поведенческом тесте «Вынужденное плавание с грузом». Экспериментальная и клиническая фармакология, 86 (lis), 90]. Когорты животных получены в результате скрещивания мышей линии A/J (#:000646), у которых была случайно обнаружена спонтанная инсерция в интроне 4, с мышами дикого типа C57BL/6J. Поддержание и размножение колонии проводили путем скрещивания мутантных животных между собой из одного помета. Мыши были рандомизированы в соответствии с массой тела и использованы для исследования специфической фармакологической активности препарата на основе аденоассоциированного вирусного вектора AAV9-ДИСФ-ДВ.

Первая группа (n=10) - отрицательный контроль - дисферлин-дефицитные мыши (шифр К-) с генотипом B6.A/J-Dysf^{prmd}; вторая группа (n=10) - положительный контроль - мыши дикого типа (шифр К+); третья группа (n=14) - дисферлин-дефицитные мыши, получающие препарат AAV9-ДИСФ-ДВ внутримышечно (в/м) в дозе 5×10^{12} ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis (шифр AAV 2 i/m).

Физическую выносливость оценивали через 3 месяца после введения препарата путем оценки времени удержания мыши на проволоке до момента падения. Тест «Удержание на проволоке» основан на инстинкте мышей избегать падения. Мышь помещается на горизонтально натянутую проволоку с захватом всеми четырьмя конечностями (диаметр 3 мм, высота над поверхностью 60 см). Способность удерживаться на проволоке измеряется путем оценки времени удержания мыши до момента падения при помощи секундомера. В качестве итогового значения был взят наилучший результат двух попыток, пауза между которыми была 20 мин [М.В. Корокин, Е.В. Кузубова, А.И. Радченко и др. Мыши B6.A-DYSFPRMD/ GENEJ как генетическая модель дисферлинопатии. Фармация и фармакология. 2022; 10(5):483-496].

Статистическую обработку проводили с использованием программной среды вычислений R. Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка и критерия Шпигельхальтера (библиотека normtest), оценку равенства дисперсий - с помощью критерия Левене (библиотека lawstat). В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела-Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа, а в качестве post-hoc анализа для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный t-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни, соответственно, с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественную проверку гипотез. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Время удержания животного на проволоке было значительно меньше у мышей с дисферлинопатией по сравнению с мышами дикого типа, на 62,8% ($p < 0,01$), что свидетельствует о снижении физической выносливости у мышей с генотипом B6.A/J-Dysf^{prmd} в возрасте 9 месяцев. Выраженная эффективность AAV9-ДИСФ-ДВ

наблюдалась в опытной группе, т.к. время удержания мышей на проволоке было больше на 94,0% ($p<0,01$), чем в группе К-, но при этом отличаясь от значений группы К+ на 27,9% ($p<0,05$) (таблица 4).

Таблица 4

Результаты исследования фармакологической активности ААВ9-ДИСФ-ДВ в тесте «Удержание на проволоке» ($Me\pm SD$), с

№ п/п	Экспериментальные группы	Время падения
1	К- (n=10)	21,7±1,8*
2	К+ (n=10)	58,4±4,1**
3	ААВ 2 i/m (n=14)	42,1±2,9**

Примечания: представлены медианы и стандартная ошибка среднего. Выборки проверены на нормальность, а статистическая достоверность оценивалась с помощью Н-критерия Крускала-Уоллиса. * - $p<0,05$ в сравнении с группой К+; ** - $p<0,05$ в сравнении с группой К-.

Таким образом, в предлагаемом способе однократное в/м введение ААВ9-ДИСФ-ДВ в дозе 5×10^{12} ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis мышцей В6.А/Ј-Dysf^{prmd} в возрасте 6 месяцев приводит к повышению физической выносливости в эксперименте на дисферлин-дефицитных мышцах, что подтверждается результатами теста «Удержание на проволоке» через 3 месяца после введения ААВ9-ДИСФ-ДВ.

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing
1.3//EN" "ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing dtdVersion="V1_3" fileName="Способ повышения
физической выносливости в эксперименте на дисферлин-дефицитных
мышцах.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2024-11-07">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>2023135268</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-12-26</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>1059</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>2023135268</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-12-26</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="ru">федеральное государственное
автономное образовательное учреждение высшего образования
"Белгородский государственный национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ")</ApplicantName>

```

```

    <ApplicantNameLatin>federal&apos;noe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatel&apos;noe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya
&quot;Belgorodskij gosudarstvennyj nacional&apos;nyj
issledovatel&apos;skij universitet&quot; (NIU
5 &quot;BelGU&quot;)</ApplicantNameLatin>
    <InventorName languageCode="ru">Корокин Михаил
Викторович</InventorName>
    <InventorNameLatin>Korokin Mikhail Viktorovich</InventorNameLatin>
    <InventionTitle languageCode="ru">Способ повышения физической
10 выносливости в эксперименте на дисферлин-дефицитных
мышцах</InventionTitle>
    <SequenceTotalQuantity>5</SequenceTotalQuantity>
    <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
15 <INSDSeq_length>133</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
20 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..133</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
25 <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q2">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
30 </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gtaagtatcaaggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgg
35 gcttgctcgagacagagaagactcttgctgttctgataggcacctattggtcttactgacatccactttgc
ctttctctccacag</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
    </SequenceData>
    <SequenceData sequenceIDNumber="2">
40 <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>775</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
45 <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..775</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>

```

```

<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
5 <INSDQualifier id="q4">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
10 </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ctagaagctgcatgtctaaagctagacccttcagattaaaaataactgag
gtaagggcctgggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctcctctatctgccatcgccctttg
gggaggaggaatgtgcccaaggactaaaaaaaggccatggagccagaggggagggcaacagaccttc
15 atgggcaaaccttggggcctgctgtctagcatgcccactacgggtctaggctgccatgtaaggaggc
aaggcctggggacacccgagatgctgttataattaaccagacatgtggctgcccccccccccccaac
acctgctgcctctaaaaataaccctgtccctggtggatcccctgcatgcaagatcttcgaacaaggctg
tgggggactgagggcaggctgtaacaggcttggggccagggttatacgtgcctgggactcccaaagta
ttactgttccatgttcccggcgaaggggccagctgtccccgccagctagactcagcacttagtttaggaa
20 ccagtgagcaagtgcaccccttggggcagccatacaaggccatggggctgggcaagctgcacgcctgggt
ccgggggtgggcacggtgcccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcaggggcccctccctggggac
agcccctcctggctagtcacaccctgtaggctcctctatataaccaggggcacaggggctgcctcatt
ctaccaccacctccacagcagcagct</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
25 </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
30 <INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
35 <INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
40 <INSDQualifier id="q6">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
45 </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggctc
gggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgcgagcgcgcgagaggggagtgggccaactccatcac

```

```

taggggttcct</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
5   <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>141</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
10    <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..141</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
15    <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
20    <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
25    <INSDSeq_sequence>aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctc
gctcactgaggccggcgaccaaaggtcgcccgacgccgggctttgccggggcgccctcagtgagcgag
cgagcgcgagctgcctgcagg</INSDSeq_sequence>
      </INSDSeq>
    </SequenceData>
30  <SequenceData sequenceIDNumber="5">
      <INSDSeq>
          <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
          <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
          <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
35    <INSDSeq_feature-table>
          <INSDFeature>
              <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
              <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
              <INSDFeature_qual>
40    <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
              </INSDQualifier>
              <INSDQualifier id="q10">
45    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
              </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
          </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
      </INSDSeq>
    </SequenceData>

```

```

    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>taagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaa
5   aaaatgctctatattgtgaaatttgtgatgctattgtcctatttgttaaccattataagctgcaataaaca
    gtt</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
    </SequenceData>
  </ST26SequenceListing>

```

10 (57) Формула изобретения

Способ повышения физической выносливости в эксперименте на дисферлин-дефицитных мышцах, включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышцей В6.А/J-Dysf^{prmd} и однократное введение двувекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса, отличающийся тем, что вводят внутримышечно

15 двувекторный препарат на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, содержащий вектор pAAV-Dysf5'-DV, несущий 5'-последовательность кДНК дисферлина, мышцеспецифичный промотор МНСК7 с SEQ ID NO: 2, химерный интрон с SEQ ID NO: 1, левый инвертированный концевой повтор (L-ITR) с SEQ ID NO: 3 и правый инвертированный концевой повтор (R-ITR) с SEQ ID NO: 4; и вектор pAAV-Dysf3'-DV,

20 несущий 3'-последовательность кДНК дисферлина, L-ITR с SEQ ID NO: 3, PolyA SV40 с SEQ ID NO: 5 и R-ITR с SEQ ID NO: 4, в дозе 5×10^{12} ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis мышцей В6.А/J-Dysf^{prmd} в возрасте 6 месяцев, на животное

25 суммарно 300 мкл, с оценкой физической выносливости через 3 месяца после введения двувекторного препарата, подтверждаемый результатами теста «Удержание на проволоке».

30

35

40

45