РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 855 421** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 15/86 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 15/86 (2025.08)

(21)(22) Заявка: **2024139369, 25.12.2024**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.12.2024

Дата регистрации:
02.02.2026

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **25.12.2024**

(45) Опубликовано: **02.02.2026** Бюл. № **4**

Адрес для переписки:
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, 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),
Патраханов Евгений Александрович (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: **КУЗУБОВА Е.В. и др. Использование двухвекторной системы на основе аденоассоциированного вируса для генной терапии миопатии Миоши на модели мышей B6.A-Dysfprmd/GeneJ, Генетические технологии в исследованиях природных соединений, Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов, Тезисы докладов конференции, 2023, стр. 20. ЯКОВЛЕВ** (см. прод.)

(54) СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ СИЛЫ ХВАТА У ДИСФЕРЛИН-ДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу увеличения силы хвата у дисферлин-дефицитных мышей в эксперименте. Указанный способ включает однократное введение мышам двувекторного препарата на основе AAV9, несущего кодон-

RU 2855421 C1

оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном, причем препарат вводят в дозе $5*10^{12}$ ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в мышцы m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis, а оценку мышечной функции в тесте «Сила хватки» проводят через 3 месяца после введения препарата. Настоящее изобретение обеспечивает эффективный способ увеличения силы хвата с использованием аденоассоциированного вирусного вектора в эксперименте на дисферлин-дефицитных мышах. 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):
И. А. и др. Двухвекторная система на основе аденоассоциированного вируса для генной терапии дисферлинопатии, Гены и клетки, 2022, vol. 17, no. 3, стр. 269-270. КОРОКИН М.В. и др. МЫШИ B6.A-DYSFPRMD/GENEJ КАК ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ, Фармация и фармакология, 2022, т. 10, no. 5, стр. 483-496. YAKOVLEV IA et al., Dual Adeno-Associated Virus 9 with Codon-Optimized DYSF Gene Promotes In Vivo Muscle Regeneration and May Decrease Inflammatory Response in Limb Girdle Muscular Dystrophy Type R2, International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(17):13551. RU 2527073 C2, 27.08.2014. US 20230279065 A1, 07.09.2023.

RU 2855421 C1

RU 2855421 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 855 421** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 15/86 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 15/86 (2025.08)

(21)(22) Application: **2024139369, 25.12.2024**

(24) Effective date for property rights:
25.12.2024

Registration date:
02.02.2026

Priority:
(22) Date of filing: **25.12.2024**

(45) Date of publication: **02.02.2026** Bull. № **4**

Mail address:
308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, 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),
Patrakhanov Evgenii Aleksandrovich (RU),
Radchenko Aleksandra Igorevna (RU),
Ekimova Natalia Viktorovna (RU)

(73) Proprietor(s):
federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi natsionalnyi issledovatelskii universitet" (NIU "BelGU") (RU)

RU 2855421 C1

(54) METHOD FOR INCREASING GRIP STRENGTH IN DYSPHERLIN-DEFICIENT MICE IN EXPERIMENT

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to a method for increasing grip strength in dysferlin-deficient mice in an experiment. The said method comprises a single administration to mice of a dual-vector preparation based on AAV9, carrying a codon-optimised cDNA of the dysferlin gene under the control of a muscle-specific promoter in combination with a chimeric intron, at that the preparation is administered at a dose of $5*10^{12}$ units of the virus with the DYSF gene in a volume of 50 mcl into the muscles m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis, and assessment of muscle function in the "Grip strength" test is carried out 3 months after administration of the preparation.

EFFECT: effective method for increasing grip strength using an adeno-associated viral vector in an experiment on dysferlin-deficient mice.

1 cl, 1 tbl, 1 ex

RU 2855421 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-Dysfprmd/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 [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.

Наиболее близким по существу предлагаемого изобретения (прототипом) является способ коррекции миодистрофии с использованием аденоассоциированного вирусного вектора в эксперименте (патент на изобретение RU 2821544, публ. 25.06.2024), включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} и однократное введение двувекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса в хвостовую вену с оценкой мышечной функции через 30 дней после инъекции препарата, причем коррекцию миодистрофии проводят препаратом на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном для усиления экспрессии дисферлина в объеме 100 мкл, подтверждаемый результатами теста «Сила хватки».

Основным недостатком способа является то, что в данном изобретении не было изучено наличие пролонгированного терапевтического эффекта двувекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном, при внутримышечном введении на дисферлин-дефицитных мышах B6.A/J-Dysf^{prmd} в тесте «Сила хватки». Внутримышечное введение обеспечивает возможность создания депо препарата в мышечной ткани, откуда оно постепенно высвобождается в течение длительного времени. Это обеспечивает пролонгированный терапевтический эффект, наличие которого клинически и экономически важно при лечении дисферлинопатии.

Задачей настоящего изобретения является создание эффективного и пролонгированного способа увеличения силы хвата у дисферлин-дефицитных мышей в эксперименте с использованием генно-инженерной конструкции на основе AAV, экспрессирующей дисферлин человека.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ увеличения силы хвата у дисферлин-дефицитных мышей в эксперименте, лишенный недостатка аналога, а именно, слабой экспрессии дисферлина при введении двух рекомбинантных AAV, за счет применения мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном для усиления экспрессии дисферлина, а также лишенный недостатка прототипа, а именно отсутствия данных о возможности обеспечения пролонгированного терапевтического действия данного препарата при его внутримышечном введении дисферлин-дефицитным мышам B6.A/J-Dysf^{prmd}.

Следует отметить, что конструкция на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном, предоставленная ООО «Генотаргет» и являющаяся разработкой и интеллектуальной собственностью ООО «Генотаргет», описана в патенте на изобретение RU 2821544, публ. 25.06.2024.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ увеличения силы хвата у дисферлин-дефицитных мышей в эксперименте, включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} и однократное введение двувекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном с оценкой мышечной функции после инъекции препарата в тесте «Сила хватки», причем препарат вводят 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, а оценку мышечной функции проводят через 3 месяца после введения препарата.

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что однократное введение двувекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном в объеме 50 мкл в m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis обеих задних конечностей приводит к выраженному и пролонгированному увеличению силы хвата у дисферлин-дефицитных у дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-Dysf^{prmd}, что подтверждается достоверным увеличением пикового значения силы тяги у мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} с введением препарата по сравнению с нелеченными животными ($p<0,05$) в тесте «Сила

хватки» через 3 месяца после введения препарата.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

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 (11s), 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 AAB9-ДИСФ-ДВ.

Первая группа (n=10) - отрицательный контроль - дисферлин-дефицитные мыши (шифр К2-) 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 AAB9-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).

О выраженности эффекта судили по мышечной функции через 3 месяца после введения препарата. Для этого проводили тест «Сила хватки».

Тест «Сила хватки». Установка представляет собой сетку из нержавеющей стали, подключенной к датчику для измерения силы хватки (в граммах) передних конечностей мыши. Животному давали ухватиться за горизонтальную сетку передними лапами, а затем мышь оттягивали назад за хвост, пока ее хватка не ослабевала, при этом задние лапы мыши не должны касаться сетки. Датчик измерения силы сохраняет пиковое значение силы тяги. Тест используется для изучения функции нейромышечной системы. Для анализа использовались среднее значения из 5 успешных измерений силы передних конечностей [Nagaraju K., Raben N., Loeffler L., Parker T., Rochon P.J., Lee E., Danning C., Wada R., Thompson C., Bahtiyar G., Craft J., Hooft Van Huijsduijnen, R., Plotz P. Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2000. №97. - P. 9209-9214; García-Campos P., Báez-Matus X., Jara-Gutiérrez C., Paz-Araos M., Astorga C., Cea L.A., Rodríguez V., Bevilacqua J.A., Caviedes P., Cárdenas A.M.. N-Acetylcysteine Reduces Skeletal Muscles Oxidative Stress and Improves Grip Strength in Dysferlin-Deficient Bla/J Mice. International journal of molecular sciences. - 2020. №16; P. 4293].

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

Сила передних конечностей в тесте «Сила хватки» была значительно снижена у мышей с диферлинопатией (группа К2-) по сравнению с мышами дикого типа (группа К+), на 26,9% ($p=0,0023$), что свидетельствует о снижении выносливости у мышей с генотипом B6.A/J-Dysf^{prmd} при развивающейся миодистрофии. Через 3 месяца после введения препарата выраженная эффективность при коррекции миодистрофии установлена в группе леченных животных, на 27,4% ($p=0,0042$) превышая показатель в группе К2-, при этом достигая целевых значений, не отличаясь от группы К+ ($p \geq 0,9999$), анализ оценки силы хватки передних конечностей в тесте «Сила хватки» (M±m), г представлен в таблице 1.

Таблица 1

№ п/п	Экспериментальные группы	Сила хватки
1	К2- (n=10)	$49,93 \pm 2,706^{y}$
2	К+ (n=10)	$68,30 \pm 3,424^{x}$
3	AAV 2 i/m (n=14)	$63,60 \pm 1,496^{x}$

Примечания: ^{x} – $p \leq 0,05$ в сравнении с группой К2-; ^{y} – $p < 0,05$ в сравнении с группой К+. Представлены медианы и стандартная ошибка среднего. Выборки проверены на нормальность, а статистическая достоверность оценивалась с помощью Н-критерия Крускала-Уоллиса.

Таким образом, в предлагаемом способе однократное внутримышечное введение препарата на основе аденоассоциированного вирусного вектора AAB9-ДИСФ-ДВ, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном, в дозе $5*10^{12}$ ед. вируса в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis (на животное суммарно 300 мкл) приводит к увеличению силы хвата у дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-Dysf^{prmd}, что подтверждается результатами теста «Сила хватки» через 3 месяца после инъекции AAB9-ДИСФ-ДВ.

(57) Формула изобретения

Способ увеличения силы хвата у дисферлин-дефицитных мышей в эксперименте, включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} и однократное введение двувекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном, с оценкой мышечной функции после инъекции препарата в тесте «Сила хватки», отличающийся тем, что препарат вводят 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, а оценку мышечной функции проводят через 3 месяца после введения препарата.