



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 15/00 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2023135153, 26.12.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.12.2023

Дата регистрации:
05.11.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.12.2023

(45) Опубликовано: 05.11.2024 Бюл. № 31

Адрес для переписки:
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, ФГАОУ
ВО НИУ "БелГУ", начальнику отдела ИС
Токtareвой Т.М.

(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: Kasun Kodippili, Chady H Hakim et
al. Dual AAV Gene Therapy for Duchenne
Muscular Dystrophy with a 7-kb Mini-Dystrophin
Gene in the Canine Model, Hum Gene Ther. 2018
Mar; 29(3): 299-311. WO 2019209777 A1,
31.10.2019. RU 2015141336 A, 22.05.2017.

(54) Способ сохранения статической выносливости у дисферлин-дефицитных мышеч в эксперименте

(57) Реферат:

Изобретение относится к областям
молекулярной биологии, вирусологии,
биомедицины и к области клеточных технологий.
Описан способ сохранения статической
выносливости у дисферлин-дефицитных мышеч
в эксперименте, включающий использование
самцов дисферлин-дефицитных мышеч В6.A/J-
Dysfrmd и введение двувекторного препарата на

основе аденоассоциированного вируса. При этом
вводят внутримышечно (в/м) препарат 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 дозе $5 \cdot 10^{12}$ ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastuslateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemiuslateralis на животное суммарно 300 мкл мышцей В6.А/J-Dysfgrmd в возрасте 6 месяцев с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения

с оценкой физической работоспособности через 3 месяца после первого введения препарата, подтверждаемой результатами теста «Удержание животного на скользком вертикальном стержне». Изобретение может быть использовано для сохранения статической выносливости. 4 табл., 1 пр.

RU 2829651 C1

RU 2829651 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 15/00 (2024.08)

(21)(22) Application: **2023135153, 26.12.2023**

(24) Effective date for property rights:
26.12.2023

Registration date:
05.11.2024

Priority:

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

(45) Date of publication: **05.11.2024** Bull. № 31

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, FGAOU VO
NIU "BelGU", nachalniku otdela IS Toktarevoj
T.M.**

(72) Inventor(s):

**Korokin Mikhail Viktorovich (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Dejkin Aleksej Vasilevich (RU),
Korokina Liliya Viktorovna (RU),
Peresypkina Anna Aleksandrovna (RU),
Gudyrev Oleg Sergeevich (RU),
Deev Roman Vadimovich (RU),
Kuzubova Elena Valerevna (RU),
Yakovlev Ivan Antonovich (RU),
Isaev Artur Aleksandrovich (RU),
Pokrovskij Vladimir Mikhajlovich (RU),
Zhunusov Nikita Sergeevich (RU),
Krayushkina Anastasiya Mikhajlovna (RU),
Radchenko Aleksandra Igorevna (RU),
Ekimova Natalya Viktorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD OF MAINTAINING STATIC ENDURANCE IN DYSFERLIN-DEFICIENT MICE IN EXPERIMENT**

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology; virology; biomedicine.

SUBSTANCE: invention relates to cell technologies. Described is a method for maintaining static endurance in dysferlin-deficient mice in experiment, involving use of male dysferlin-deficient mice B6.A/J-Dysfprmd and administering a two-vector adeno-associated virus preparation. A preparation based on adeno-associated virus of serotype 9 is administered intramuscularly (i. m.), carrying a codon-optimized cDNA of the dysferlin gene under the control of a muscle-specific promoter in combination with a chimeric intron to enhance dysferlin expression in dose of $5 \cdot 10^{12}$ units

virus with the DYSF gene in amount of 50 mcl in the following muscles of both hind limbs: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis per animal in total 300 mcl of mice B6.A/J-Dysfprmd at age of 6 months with repeated administration of preparation 1 month after the first administration with assessment of physical performance 3 months after the first administration of the preparation, which is confirmed by the results of the test "Animal retention on a slippery vertical rod".

EFFECT: invention can be used to preserve static endurance.

1 cl, 4 tbl, 1 ex

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

По известным литературным источникам – дисферлинопатия – это фенотипически гетерогенная прогрессирующая миодистрофия, вызванная мутациями в гене DYSF (2p13), который кодирует трансмембранный белок дисферлин (230 кДа), участвующий в восстановлении сарколеммы [Reash N.F., James M.K., Alfano L.N. et al. Comparison of strength testing modalities in dysferlinopathy // *Muscle Nerve*. – 2022. – Vol. 66, No. 2. – P. 159–166]. К данной группе заболеваний относится дистальная миопатия Миоши [Bardakov S.N., Tsargush V.A., Carlier P.G. et al. Magnetic resonance imaging pattern variability in dysferlinopathy // *Acta Myol*. – 2021. – Vol. 40, No. 4. – P. 158–171]. Манифестация заболевания приходится на поздний подростковый возраст – ранний взрослый возраст с последующим неуклонным прогрессированием мышечной слабости и утратой амбулаторного статуса в 35–45 лет [Fanin M., Angelini C. Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy // *Muscle Nerve*. – 2016. – Vol. 54, No. 5. – P. 821–835].

Возможность восстановления дефектного белка мышц путем введения в клетку функционального гена дикого типа является перспективным методом генной терапии миодистрофий [Старостина И.Г. Создание рекомбинантного аденовируса, кодирующего кодон-оптимизированный ген дисферлина, и анализ экспрессии рекомбинантного белка в культуре клеток *in vitro* / И.Г. Старостина, В.В. Соловьева, К.Г. Шевченко, Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.А. Ризванов // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2012. – Т.7, №3. – С.25–28]. Ранее было показано, что генная терапия с использованием рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV) безопасна и хорошо переносится [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].

Ранее с использованием тестов «Перевернутая сетка», «Сила хватки», «Удержание на проволоке», «Вынужденное плавание с грузом», «Удержание животного на скользком вертикальном стержне» было показано, что отсутствие экспрессии гена *Dysf*^{-/-} у мышей сублинии B6.A/J-*Dysf*^{prmd} может приводить к мышечной дистрофии. Данная патология проявляла себя с начала развития фенотипических проявлений болезни с 12 недели жизни и пиком фенотипических проявлений к 24 неделе жизни животных. 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-DYSFPRMD/GENEJ как генетическая модель дисферлинопатии. *Фармация и фармакология*. 2022;10(5):483-496].

Известен способ терапии дисферлинопатий с применением кодон-оптимизированной кДНК, кодирующей дисферлин человека (патент на изобретение RU 2527073, публ.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, мезанхимальных, 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 сохранения статической выносливости у дисферлин-дефицитных мышей с использованием генно-инженерной конструкции на основе AAV, экспрессирующей дисферлин человека.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ сохранения статической выносливости у дисферлин-дефицитных мышей, лишенный недостатков 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 сохранения статической выносливости у дисферлин-дефицитных мышей в эксперименте, включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} и введение двухвекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса, причем вводят внутримышечно (в/м) AAV9-ДИСФ-ДВ 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 дозе $5 \cdot 10^{12}$ 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) мышцей B6.A/J-Dysf^{prmd} в возрасте 6 месяцев с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения с оценкой физической работоспособности через 3 месяца после первого введения AAV9-ДИСФ-ДВ, подтверждаемый результатами теста «Удержание животного на скользком вертикальном стержне».

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что в/м введение ААВ9-ДИСФ-ДВ в дозе 5*1012 ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastuslateralis, m. tibialis anterior, m.

gastrocnemiuslateralis мышцей В6.А/Ј-Dysfprmd в возрасте 6 месяцев с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения приводит к сохранению статической выносливости у дисферлин-дефицитных мышечей, что подтверждается достоверным увеличением времени удержания на скользком вертикальном стержне мышцей В6.А/Ј-Dysfprmd с введением ААВ9-ДИСФ-ДВ, на 23,0% (p<0,05) по сравнению с нелечеными животными в тесте «Удержание животного на скользком вертикальном стержне», так как двойные ААВ 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 ААВ9-ДИСФ-ДВ

Пример 1

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

Таблица 1

Химерный интрон (CI)	gtaagtatcaagggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgggctgtcgagacagagaagactcttgcgtttctgataggcacctattgtcttactgacatccac ttgctcttctctccacag (SEQ ID NO: 1)
----------------------	---

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

Таблица 2

Наименование характеристики	Целевое значение
Регуляторная последовательность (промотор МНСК7)	ctagaagctgcatgtctaagctagacccttcagattaaaaataactgagtaaggcctgggtgagggaggtgtgtgagagcctctgtctctctctatctgcc atcgccctttgggaggagggaatgtgcccaaggactaaaaaaaggccatggagccagaggggcgagggcaacagacctttcatggcaaaccttggggcc ctgctgtctagcatgccccactacgggtctagggctgccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgcctgttataaataaccagacatgtggctg ccccccccccaaacctctgctctctaaaaataaccctgtccctggtgatccctgcatgcaagatcttgaacaaggctgtgggggactgaggcgagg ctgtaacaggccttggggccagggttatacgtgctgctgggactcccaagttactgttccatgttcccggcgaaggccagctgtccccccgagctagactca gcacttagtttagaacagctgagcaagctgagcccttggggcagccatacaaggccatggggctgggcaagctgcacgcctgggtccgggtgggcacggt gccgggcaacgagctgaaagctcatctgctcagggccctccctgggacagcccctctgctgctacacccctgtaggctctctataaaccaggg gcacaggggctgcccctattctaccacacccctccacagcagagct (SEQ ID NO: 2)
Химерный интрон (CI)	gtaagtatcaaggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgggctgtcgagacagagaagactcttgcgtttctgataggcacctattgtcttactgac atccacttgccttctctccacag (SEQ ID NO: 3)
Левый инвертированный концевой повтор (L-ITR)	cctgcaggcagctgcgctgctcgtcactgagggcggccggcgctggcgacaccttgggtgcccggcctcagtgagcagcagcgcgcagagaggg agtggccaactccatcactaggggttct (SEQ ID NO: 4)
Правый инвертированный концевой повтор (R-ITR)	aggaaccctagtgatgaggtggccactccctctctgcgctcgtcgtcactgagggcggcgaccacaaggtcggccgacggccggcttggccgggc ggcctcagtgagcagcagcgcgcagctgctgcagg (SEQ ID NO: 5)

Этап 3. 3' последовательность дисферлина была клонирована в вектор для сборки ААВ (рААВ-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)	cctgcaggcagctgcgctgctcgtcactgagggcggccggcgctggcgacaccttgggtgcccggcctcagtgagcagcagcgcgcagagaga gggagtgggccaactccatcactaggggttct (SEQ ID NO: 6)
Сигнал полиаденилирования SV40 (PolyA SV40)	taagatacattgatgagtttgacaaccacaactagaaatgagctgaaataatgctctatttggaaattgtgatgctattgtcctatttgaaccattataagctg caataaacaagtt (SEQ ID NO: 7)
Правый инвертированный концевой повтор (R-ITR)	aggaaccctagtgatgaggtggccactccctctctgcgctcgtcgtcactgagggcggcgaccacaaggtcggccgacggccggcttggccgg gcggcctcagtgagcagcagcgcgcagctgctgcagg (SEQ ID NO: 8)

Этап 4. Была проведена проверка последовательностей плазмид рААВ-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.

5 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 0,22мкм и замораживали в буфере для хранения 10 вирусных препаратов: 1x PBS, 350mM NaCl, 0,001% Pluronic F68 в пробирках типа эппендорф по 0,5мл. Аликвоты вирусных препаратов отбирали перед замораживанием для контроля качества.

15 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+13гк/мл для AAV9-Dysf5'-DV и 2,06E+13гк/мл для AAV9-Dysf3'-DV соответственно.

20 В ходе работ были получены 2 плазмидные конструкции, кодирующие кДНК дисферлина pAAV-Dysf5'-DV и pAAV-Dysf3'-DV. Последовательности полученных плазмид были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Полученные плазмиды были трансформированы в штамм Top10 E.coli для выделения.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ААВ9-ДИСФ-ДВ

25 Эксперименты проведены на 34 мышах сублинии B6.A/J-Dysfprmd массой 27-33 г в возрасте 6 месяцев, полученных из испытательного центра «Виварно-экспериментальный комплекс ООО «НИИ Митоинженерии МГУ». 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. 30 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 ААВ9-ДИСФ-ДВ.

35 Первая группа (n=10) – отрицательный контроль – дисферлин-дефицитные мыши (шифр К-) с генотипом B6.A/J-Dysfprmd; вторая группа (n=10) – положительный контроль – мыши дикого типа (шифр К+); третья группа (n=14) – дисферлин-дефицитные мыши, получающие препарат ААВ9-ДИСФ-ДВ в/м в дозе 5*10¹² ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastuslateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemiuslateralis с повторным введением препарата (шифр ААВ 40 3 i/m).

Для оценки сохранности статической выносливости у дисферлин-дефицитных мышей использовался тест «Удержание животного на скользком вертикальном стержне». Установка представляет из себя штатив с диаметром стержня 7 мм, высотой 60 см с установленным на верхушке пластиковым ограждением. Для проведения эксперимента 45 животное помещали на одинаковом расстоянии от верхушки стержня строго вверх головой, не менее 1 м над полом. Фиксировали время падения животного со стержня при помощи секундомера. О сохранности статической выносливости судили путем сравнения с контрольной группой [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 стержне было значительно меньше у мышей с дисферлинопатией по сравнению с мышами дикого типа, на 16,5% ($p < 0,05$), что свидетельствует о снижении статической выносливости у мышей с генотипом B6.A/J-Dysfprmd при развивающейся миодистрофии. Выраженная эффективность ААВ9-ДИСФ-ДВ наблюдалась в опытной группе, т.к. время удержания мышей на скользком стержне было больше на 23,0% ($p < 0,05$), чем в группе К-, при этом достигая целевых значений (таблица 4).

Таблица 4

Результаты исследования фармакологической активности ААВ9-ДИСФ-ДВ в тесте «Удержание животного на скользком вертикальном стержне»

(Me \pm SD), с

№ п/п	Экспериментальные группы	Время падения
1	К- (n=10)	24,3 \pm 1,7*
2	К+ (n=10)	29,1 \pm 2,1**
3	ААВ 3 i/m (n=14)	29,9 \pm 2,4**

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

Таким образом, в предлагаемом способе в/м введение ААВ9-ДИСФ-ДВ в дозе 5*10¹² ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastuslateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemiuslateralis мышью B6.A/J-Dysfprmd в возрасте 6 месяцев с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения приводит к сохранению статической выносливости у дисферлин-дефицитных мышей, что подтверждается результатами теста «Удержание животного на скользком вертикальном стержне» через 3 месяца после первого введения ААВ9-ДИСФ-ДВ.

(57) Формула изобретения

Способ сохранения статической выносливости у дисферлин-дефицитных мышей в эксперименте, включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-Dysfprmd и введение двувекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса, отличающийся тем, что вводят внутримышечно (в/м) препарат 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 дозе $5 \cdot 10^{12}$ ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastuslateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemiuslateralis на животное суммарно 300 мкл мышцей В6.А/J-Dysfprmd в возрасте 6 месяцев с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения с оценкой физической работоспособности через 3 месяца после первого введения препарата, подтверждаемый результатами теста «Удержание животного на скользком вертикальном стержне».

10

15

20

25

30

35

40

45