РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 873 112**(13) **C1**

(51) МПК
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 48/00 *(2026.08);* ***C12N 15/85*** *(2026.08);* ***C12N 15/861*** *(2026.08);* ***A61P 25/00*** *(2026.08)*

(21)(22) Заявка: **2026108133, 25.03.2026**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.03.2026

Дата регистрации:
02.11.2026

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **25.03.2026**

(45) Опубликовано: **02.11.2026** Бюл. № 31

Адрес для переписки:
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ "БелГУ", РЦИС, Цурикова Наталья Дмитриевна

(72) Автор(ы):
Корокин Михаил Викторович (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Щеблыкина Олеся Викторовна (RU),
Костина Дарья Александровна (RU),
Апостол Алина Александровна (RU),
Лебедев Петр Романович (RU),
Корокина Лилия Викторовна (RU),
Пересыпкина Анна Александровна (RU),
Гудырев Олег Сергеевич (RU),
Фролова Мария Евгеньевна (RU),
Кузубова Елена Валерьевна (RU),
Слепов Юрий Константинович (RU),
Исаев Артур Александрович (RU),
Покровский Владимир Михайлович (RU),
Жунусов Никита Сергеевич (RU),
Радченко Александра Игоревна (RU),
Степенко Юлия Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Белгородский государственный национальный исследовательский университет" (НИУ "БелГУ") (RU),
Общество с ограниченной ответственностью "Свифтген" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Lin T. C. et al. Intraventricular continuous BDNF administration ameliorates neuroinflammation and enhances neurogenesis against rodent intracerebral hemorrhage model. Frontiers in Neurology, 2025, v. 16, найдено в сети Интернет 22.07.2026, https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12394972/. Wang J. et al. Administration of intramuscular AAV-BDNF** (см. прод.)

(54) **Способ коррекции неврологического дефицита при геморрагическом инсульте с использованием препарата на основе аденоассоциированного вируса, несущего нейротрофический фактор proBDNF, в эксперименте**

RU 2873112 C1

RU 2873112 C1

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описан способ коррекции неврологического дефицита при геморрагическом инсульте с использованием препарата на основе аденоассоциированного вируса, несущего нейротрофический фактор proBDNF, в эксперименте, включающий использование самцов лабораторных грызунов и моделирование внутримозгового кровоизлияния в правую гемисферу головного мозга с коррекцией неврологического дефицита. Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ коррекции неврологического дефицита при геморрагическом инсульте (ГИ) с использованием препарата на основе аденоассоциированного вируса, несущего нейротрофический фактор proBDNF, в эксперименте, лишенный иммуногенности экзогенного рекомбинантного белка, и обеспечение долговременной выработки собственного proBDNF. 1 ил., 2 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

and intranasal AAV-TrkB promotes neurological recovery via enhancing corticospinal synaptic connections in stroke rats. Experimental Neurology, 2023, v. 359, найдено в сети Интернет 22.07.2026, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488622002618. RU 2757932 C2, 25.10.2021. WO 2017072498 A1, 04.05.2017. Lin L.Y. et al. Peripheral ProBDNF delivered by an AAV vector to the muscle triggers depression-like behaviours in mice. Neurotoxicity Research, 2020, v. 38(3), p. 626-639 найдено в сети Интернет 22.07.2026, https://link.springer.com/article/10.1007/s12640-020-00256-3.

RU 2873112 C1

RU 2873112 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 873 112**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 48/00 *(2026.08);* ***C12N 15/85*** *(2026.08);* ***C12N 15/861*** *(2026.08);* ***A61P 25/00*** *(2026.08)*

(21)(22) Application: **2026108133, 25.03.2026**

(24) Effective date for property rights:
25.03.2026

Registration date:
02.11.2026

Priority:
(22) Date of filing: **25.03.2026**

(45) Date of publication: **02.11.2026** Bull. № **31**

Mail address:
308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU", RTSIS, Tsurikova Natalya Dmitrievna

(72) Inventor(s):
Korokin Mikhail Viktorovich (RU),
Pokrovskii Mikhail Vladimirovich (RU),
Shcheblykina Olesia Viktorovna (RU),
Kostina Daria Aleksandrovna (RU),
Apostol Alina Aleksandrovna (RU),
Lebedev Petr Romanovich (RU),
Korokina Liliia Viktorovna (RU),
Peresypkina Anna Aleksandrovna (RU),
Gudyrev Oleg Sergeevich (RU),
Frolova Mariia Evgenevna (RU),
Kuzubova Elena Valerevna (RU),
Slepov Iurii Konstantinovich (RU),
Isaev Artur Aleksandrovich (RU),
Pokrovskii Vladimir Mikhailovich (RU),
Zhunusov Nikita Sergeevich (RU),
Radchenko Aleksandra Igorevna (RU),
Stepenko Iuliia Vladimirovna (RU)

(73) Proprietor(s):
federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi natsionalnyi issledovatelskii universitet" (NIU "BelGU") (RU),
Obshchestvo s ogranichennoi otvetstvennostiu «Sviftgen» (RU)

(54) **METHOD FOR CORRECTING NEUROLOGICAL DEFICIT IN HEMORRHAGIC STROKE USING DRUG BASED ON ADENO-ASSOCIATED VIRUS CARRYING NEUROTROPHIC FACTOR proBDNF, EXPERIMENT**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method for correcting neurological deficit in hemorrhagic stroke using a drug based on an adeno-associated virus carrying the neurotrophic factor proBDNF is described in an experiment that includes the use of male laboratory rodents and modeling of intracerebral hemorrhage in the right hemisphere of the brain with correction of neurological deficit.

EFFECT: reliable method for correcting neurological deficit in hemorrhagic stroke (HS) using a drug based on an adeno-associated virus carrying the neurotrophic factor proBDNF, in an experiment devoid of the immunogenicity of the exogenous recombinant protein, and ensuring long-term production of its own proBDNF.

1 cl, 1 dwg, 2 tbl, 1 ex

RU 2873112 C1

RU 2873112 C1

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

По известным литературным источникам - спонтанное внутримозговое кровоизлияние (ВМК) представляет собой потенциально опасное для жизни неврологическое заболевание, на долю которого приходится 10-15% всех случаев госпитализации, связанных с инсультом, и для которого до настоящего времени не существует эффективных методов лечения [Krafft PR, Rolland WB, Duris K, et al. Modeling intracerebral hemorrhage in mice: injection of autologous blood or bacterial collagenase. J Vis Exp. 2012;(67) :e4289]. Было показано, что экспрессия мРНК BDNF в окологематомальных тканях значительно повышается после травмы, вызванной ВМК [Guo YC, Song XK, Xu YF, Ma JB, Zhang JJ, Han PJ (2017) The expression and mechanism of BDNF and NGB in perihematomal tissue in rats with intracerebral hemorrhage. Eur Rev Med Pharmacol Sci 21:3452-3458]. BDNF в спинномозговой жидкости способствует нейрогенезу после ВМК, включая пролиферацию и дифференцировку нейрональных стволовых клеток в нейробласты в модели на крысах и у пациентов с ВМК [Lin TC, Tsai YC, Chen YA, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to neurogenesis after intracerebral hemorrhage: a rodent model and human study. Front Cell Neurosci. 2023;17:1170251]. Имеется достаточный массив данных, чтобы утверждать, что BDNF влияет как на передачу нервного импульса через пре- и постсинаптические механизмы, участвует в модуляции синаптической пластичности и играет важную роль в процессах обучения и формирования памяти. Взаимодействие BDNF с TrkB-рецептором активирует потенциал-зависимые натриевые и калиевые каналы, что ведет к открытию NMDA-рецепторов и изменению экспресии ГАМКа-рецепторов через PI3 и PKC сигнальные пути [Митрошина, Елена Владимировна. Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекторного действия BDNF и GDNF при моделировании гипоксии и нейродегенерации: диссертация... доктора биологических наук: 1.5.5. / Митрошина Елена Владимировна; [Место защиты: ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; Диссовет 24.2.340.06 (Д 212.166.21)]. - Нижний Новгород, 2022. - 296 с. : ил.].

Как известно, 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].

Известен способ коррекции нейровоспаления после ВМК у мышей CD1 [Yan J, Zuo G, Sherchan P, et al. CCR1 Activation Promotes Neuroinflammation Through CCR1/TPR1/ ERK1/2 Signaling Pathway After Intracerebral Hemorrhage in Mice. Neurotherapeutics. 2020;17 (3):1170-1183]. Мышей анестезировали и укладывали на живот в стереотаксическую головную раму. Просверливали черепное отверстие диаметром 1 мм, и шприц Hamilton стереотаксически вводили в правый базальный ганглий (координаты: 0,2 мм кзади и 2,2 мм латеральнее брегмы, 3,5 мм ниже твердой мозговой оболочки). В правый базальный ганглий вводили в общей сложности 30 мкл крови с помощью микроинфузионного насоса, сначала 5 мкл крови, а затем 25 мкл через 5 минут. Иглу оставляли на месте еще на 5 минут после завершения инъекции 30 мкл, чтобы предотвратить возможную утечку, после чего медленно извлекали со скоростью 1 мм/ мин. Черепное трепанационное отверстие запечатывали костным воском, а разрез кожи головы зашивали. Селективный антагонист CCR1 Met-RANTES вводили интраназально через 1 час после инъекции аутологичной крови. Для выяснения потенциального

механизма перед введением Met-RANTES вводили специфический активатор ERK1/2 (церамид C6). Активатор CCR1 (рекомбинантный CCL5, rCCL5) и CRISPR TPR1 были введены интактным мышам. Были проведены нейроповеденческие оценки, анализ содержания воды в головном мозге, иммунофлуоресцентное окрашивание и вестерн-блоттинг. Кратковременные нейроповеденческие функции оценивались с помощью модифицированного теста Гарсии, теста на размещение передних конечностей и теста на поворот в углу через 24 и 72 часа после ВМК. Ингибирование CCR1 с помощью Met-RANTES улучшило неврологическую функцию, уменьшило отек головного мозга и подавило активацию микроглии/макрофагов и инфильтрацию нейтрофилов после ВМК.

Как известно, Met-RANTES - это рекомбинантный белок, результат модификации рекомбинантного CCL5 (RANTES). N-концевая протеолитическая обработка модулирует биологическую активность и рецепторную специфичность RANTES/CCL5. Катепсин G расщепляет RANTES на вещество, лишенное трех N-концевых остатков (4-68 RANTES), которое связывается с CCR5, но проявляет более низкую хемотаксическую и противовирусную активность, чем необработанный RANTES [Lim JK, Lu W, Hartley O, DeVico AL. N-terminal proteolytic processing by cathepsin G converts RANTES/CCL5 and related analogs into a truncated 4-68 variant. J Leukoc Biol. 2006;80(6):1395-1404].

Недостатком данного способа является быстрая биодеградация Met-RANTES под действием катепсина G, что может обусловливать короткий период полувыведения Met-RANTES. Помимо этого, данное исследование сосредоточено только на нейровоспалении, опосредованном CCR1, после ВМК. Необходимы дальнейшие исследования для изучения роли активации CCR1 в апоптозе нейронов и нарушении гематоэнцефалического барьера [Gong L, Manaenko A, Fan R, et al. Osteopontin attenuates inflammation via JAK2/STAT1 pathway in hyperglycemic rats after intracerebral hemorrhage. Neuropharmacology. 2018;138:160-169]. Кроме того, патофизиология нейровоспаления после ВМК представляет собой сложную сеть, поэтому нельзя исключить вклад других сигнальных путей.

Наиболее близким по существу предлагаемого изобретения (прототипом) является способ уменьшения нейровоспаления и усиления нейрогенеза на модели ВМК у самцов крыс Sprague-Dawley с непрерывным внутрижелудочковым введением BDNF [Lin TC, Kawabori M, Yoshie E, Nakahara Y, Tsai LK, Fujimura M. Intraventricular continuous BDNF administration ameliorates neuroinflammation and enhances neurogenesis against rodent intracerebral hemorrhage model. Front Neurol. 2025;16:1606606], включающий воспроизведение модели острого ВМК у самцов крыс Sprague-Dawley, которым вводили коллагеназу во внутреннюю капсулу головного мозга. Подкожно имплантировали внутрижелудочковую мини-помпу, кончик катетера которой вводили в контралатеральный желудочек для доставки BDNF в течение 7 дней подряд. Функциональную оценку проводили в течение 14 дней после ВМК, а также выполняли иммуногистохимический анализ для оценки нейрогенеза, апоптоза и нейровоспаления в перигематомальной области и субвентрикулярной зоне.

Основным недостатком способа является то, что человеческий рекомбинантный BDNF может быстро распадаться. Это связано с особенностями транспорта белка, а также с процессами, которые происходят в клетках, а именно расщеплением BDNF под действием протеаз [Живкович М., Ермолаева Е.В., Соболева А.В., Самойлова Е.М., Чудакова Д.А., Баклаушев В.П. Нейротрофический фактор мозга BDNF: новые данные, функции и вопросы // Гены и Клетки. - 2024. - Т. 19. - №1. - С. 61-84]. Помимо этого, использование имплантированной внутрижелудочковой мини-помпы может быть связано с риском осложнений, например, бактериальной инфекции. Кроме этого, на

чужой белок (антиген) может развиться иммунный ответ.

Преимущество использования рекомбинантного AAV в генной терапии можно объяснить отсутствием иммуногенности и дополнительной безопасностью из-за дефектности его репликации и способности опосредовать более долгосрочную экспрессию в различных тканях [Lai, C. M., Lai, Y. K., & Rakoczy, P. E. (2002). Adenovirus and adeno-associated virus vectors. DNA and cell biology, 21(12), 895-913].

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ коррекции неврологического дефицита при геморрагическом инсульте (ГИ) с использованием препарата на основе аденоассоциированного вируса, несущего нейротрофический фактор proBDNF, в эксперименте, под лабораторным кодом AAV-proBDNF, лишенный недостатков аналога, а именно, иммуногенности экзогенного рекомбинантного белка, и обеспечение долговременной выработки собственного proBDNF, и недостатков прототипа, а именно, отсутствия необходимости использования внутрижелудочковой мини-помпы для непрерывного введения BDNF, так как однократное внутривенное (в/в) введение конструкции AAV-proBDNF приводит к долговременной выработке собственного proBDNF, который превращается в зрелый BDNF.

Задачей настоящего изобретения является создание эффективного способа коррекции неврологического дефицита при ГИ с использованием генно-инженерной конструкции на основе AAV, стимулирующей долговременную выработку proBDNF.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ коррекции неврологического дефицита при геморрагическом инсульте с использованием препарата на основе аденоассоциированного вируса, несущего нейротрофический фактор proBDNF, в эксперименте, включающий использование самцов лабораторных грызунов и моделирование ВМК в правой гемисфере головного мозга с коррекцией неврологического дефицита, причем эксперимент проводят на мышах CD1, аденоассоциированный вирусный вектор AAV-proBDNF вводят однократно в латеральную хвостовую вену за 4 недели до моделирования стриатокапсулярного ВМК в дозе $2*10^{11}$ ед., а оценку неврологического статуса экспериментальных животных проводят с использованием шкалы Гарсия через 24 часа после моделирования ГИ, а также на 3, 7, 14, 21 и 28 сутки.

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что однократное в/в введение AAV-proBDNF в объеме 0,2 мл в дозе $2*10^{11}$ ед. предварительно за 4 недели до моделирования патологии приводит к выраженной коррекции неврологического дефицита у самцов мышей CD1, что подтверждается результатами оценки неврологического статуса по шкале Гарсия на 14, 21 и 28 сутки после моделирования ГИ.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ AAV-proBDNF

Пример 1

Этап 1.

Методом тройной транзиентной трансфекции в клетках HEK293T были получены партии рекомбинантного вирусного вектора AAV-proBDNF. Вирусный препарат был очищен от клеточного дебриса, примесных белков и пустых вирусных капсидов. Вирусный препарат стерилизовали фильтрацией с использованием шприцевого фильтра с диаметром пор 0,22 мкм, затем замораживали в буфере для хранения вирусных препаратов: 1×PBS/213 mM NaCl/0,001% Pluronic F-68 в пробирках типа «Эппендорф». Аликвоты вирусного препарата отбирали перед замораживанием для контроля качества.

Этап 2.

Концентрацию вирусных векторов определяли количественной ПЦР в реальном времени с использованием зондов и праймеров к инвертированным повторам по отработанной ранее в лаборатории методике [Aurnhammer C., Haase M., Muether N., Hausl M., Rauschhuber C., Huber I., Nitschko H., Busch U., Sing A., Ehrhardt A., Baiker A. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences // Hum Gene Ther Methods. - 2012. - doi: 10.1089/hgtb.2011.034]. Титр вирусных частиц в конечном препарате составляет 2,75E+13 ГК/мл для AAV-proBDNF.

Для исследования секреции BDNF была сконструирована AAV-трансферная плазмида. Конструкция представляет собой рекомбинантную плазмиду длиной ~4,0-4,3 т.п.н., содержащую терапевтическую кассету, фланкированную 5'- и 3'-ITR AAV2, и стандартный бактериальный плазмидный скелет (pUC ori + AmpR) для клонирования и амплификации в E. coli.

Конструкция CMV-BDNF с эндогенным сигнальным пептидом (таблица 1)

Промотор CMV (поз. 386-939) обеспечивает сильную конститутивную экспрессию в широком спектре клеток млекопитающих. Сигнальный пептид BDNF (поз. 970-1023) обеспечивает котранслокацию и физиологическую протеолитическую обработку про-BDNF до зрелой формы. Кодирующая последовательность BDNF (поз. 1024-1380) дополнена С-концевым HA-тегом (поз. 1381-1407) для иммунологической детекции. Poly(A)-сигнал BGH (поз. 1465-1672) обеспечивает эффективное завершение транскрипции и полиаденилирование мРНК.

Таблица 1

Наименование характеристики	Целевое значение
Регуляторная последовательность (промотор CMV)	gacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatgg agttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgccc attgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgg gtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccc cctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatggga ctttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagta catcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtca atgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccatt gacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagct (SEQ ID NO: 1)
Сигнальная последовательность BDNF	atgaccatccttttccttactatggttatttcatactttggttgcatgaaggct (SEQ ID NO: 2)
Кодирующий участок BDNF (mature domain)	cactctgaccctgcccgccgaggggagctgagcgtgtgtgacagtattagtgagtgggtaacg gcggcagacaaaaagactgcagtggacatgtcgggcgggacggtcacagtccttgaaaaggt ccctgtatcaaaaggccaactgaagcaatacttctacgagaccaagtgcaatcccatgggttaca caaaagaaggctgcaggggcatagacaaaaggcattggaactcccagtgccgaactacccag tcgtacgtgcgggcccttaccatggatagcaaaaagagaattggctggcgattcataaggatag acacttcttgtgtatgtacattgaccattaaaaggggaaga (SEQ ID NO: 3)
С-концевая HA-метка	tacccatacgatgttccagattacgct (SEQ ID NO: 4)
Poly(A)-сигнал гормона роста быка (bGH)	ctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggt gccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattc tattctgggggggtggggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcagg catgctggggatgcggtgggctctatgg (SEQ ID NO: 5)
Левый инвертированный концевой повтор (5'-ITR AAV2)	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttgg tcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagg ggttcct (SEQ ID NO: 6)
Правый инвертированный концевой повтор (3'-ITR AAV2)	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgg gcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcg cgcag (SEQ ID NO: 7)

AmpR-последовательность	atgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcac ccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcg aactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatga gcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcg gtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatctta cggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggc caacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatggggg atcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcg tgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactactta ctctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctg cgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcg cggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgg ggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaa gcattggtaa (SEQ ID NO: 8)
pUC ori	ttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtg gtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcag ataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgc ctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttac cgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggtt cgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgag ctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggca gggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtc ctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcc tatggaaa (SEQ ID NO: 9)

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА AAV-proBDNF

С целью оценки эффективности разрабатываемой генетической конструкции было проведено исследование in vivo на 3-4 месячных мышах-самцах CD1 массой 30-35 г с использованием модели ВМК. С целью воспроизведения у экспериментальных животных ГИ использовали модель инъекции аутологичной цельной крови в правую гемисферу головного мозга, стриатум, координаты: 2,3 мм латерально, 0,2 мм каудально от брегмы, глубина 3,0 и 3,5 мм. Моделирование патологии осуществляли на 28 день после выполнения процедуры доставки AAV с геном proBDNF (PBS в группе контроля) по ранее опубликованной методике [Deev RV, Shcheblykina OV, Gureev VV, Kostina DA, Slepov LuK, Zhunusov NS, Korokina LV, Gudyrev OS, Osipova OA, Repina EL, Nesterov AV, Pokrovskaya TG (2026) Platform for preclinical screening of neuroprotective strategies: a clinically relevant ICH model and standardized functional test battery. Research Results in Pharmacology 12(1):1-7].

В группу «proBDNF в/в до ГИ» вошли 15 животных с предварительным за 4 недели до моделирования ГИ в/в введением AAV с геном proBDNF в дозе $2*10^{11}$ ед. в объеме 0,2 мл. В группу контроля «PBS» вошли 15 животных с введением фосфатно-солевого буфера предварительно за 4 недели до моделирования ГИ.

Через 24 часа после моделирования ГИ, а также на 3, 7, 14, 21 и 28 сутки проводили оценку неврологического статуса экспериментальных животных с использованием шкалы Гарсия. Для оценки функционального результата кровоизлияния в правую гемисферу головного мозга мышей была использована шкала Гарсия, которая оценивает

двигательные и сенсорные функции (таблица 2). Эта комплексная оценка состоит из семи независимых подтестов, оценивающих спонтанную активность (0-3 балла), аксиальную чувствительность (1-3 балла), проприоцепцию вибрисс (1-3 балла), симметрию движения конечностей (0-3 балла), боковой поворот (0-3 балла), ходьбу на передних конечностях (0-3 балла) и лазание (1-3 балла). Окончательный нейробалл, присвоенный каждому животному, представляет собой сумму семи индивидуальных баллов теста. Минимальный балл - 3 (худший результат), максимальный - 21 (лучший результат).

Таблица 2 - Шкала Гарсия для оценки неврологического дефицита у мышей

Тесты	Оценка
Спонтанная активность:	
мышь приблизилась как минимум к 3 стенам клетки:	3
мышь приблизилась менее чем к 3 стенам	2
мышь едва двигалась	1
мышь вообще не двигалась	0
Аксиальное ощущение:	
мышь одинаково испугана с обеих сторон	3
асимметричный ответ	2
отсутствие ответа с одной стороны	1
Проприоцепция вибрисс:	
мышь одинаково поворачивала голову в обе стороны	3
асимметричный ответ	2
отсутствие ответа с одной стороны	1
Симметрия движения конечностей (мышь подвешивается за хвост):	
все конечности вытянуты симметрично	3
асимметричное вытягивание	2
конечности с одной стороны показали минимальное движение	1
гемиплегия (отсутствие движения конечностей)	0
Боковой поворот (палочкой проводят вдоль каждой стороны тела, вызывая боковой поворот в сторону стимула):	
животное поворачивается не менее чем на 45° в обе стороны	3
животное поворачивается одинаково в обе стороны, но менее чем на 45°	2
неравномерный поворот	1
никакого поворота вообще	0
Вытягивание передних конечностей (касание передними лапами края стола):	

передние конечности одинаково вытянуты, симметричная ходьба	3
асимметричное вытягивание и нарушенная ходьба на передних лапах	2
минимальное движение одной передней конечности	1
гемиплегия (отсутствие движения конечности)	0
Лазание (мышь помещают на шероховатую поверхность под углом 45° к столу):	
мышь забралась на вершину поверхности	3
асимметричное или нарушенное лазание	2
животное не смогло залезть или проявило тенденцию к кружению	1
Общий балл:	3-21

Все полученные в ходе исследования данные были подвергнуты статистической обработке с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 и IBM SPSS Statistics 26. Используя методы описательной статистики данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с применением критерия Шапиро-Уилка. Также рассчитывали относительные и средние величины (среднее арифметическое (M), медиана (Me)), стандартное отклонение (SD), межквартильный интервал (IQR). При нормальном распределении данные были представлены в виде M±SD, при распределении отличном от нормального - в виде медианы (Me) с указанием интерквартильного размаха (IQR). Анализ межгрупповых различий проводили с применением параметрических или непараметрических методов, в зависимости от типа распределения. При нормальном распределении для сравнения двух выборок использовался критерий Стьюдента. При распределении отличном от нормального использовался U-тест Манна и Уитни. Различия считались значимыми при $p<0,05$.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

На первые сутки после моделирования ГИ у всех экспериментальных животных наблюдалось развитие патологической неврологической симптоматики в виде контралатерального сенсо-пирамидного дефицита с преимущественным вовлечением передней конечности. Результаты, полученные в контрольной группе «PBS», демонстрируют динамику ограниченного спонтанного восстановления неврологического дефицита после моделирования ГИ: отмечалось типичное для данной модели утяжеление неврологической симптоматики в течение первых трёх суток с последующим неполным регрессом неврологического дефицита к 21-м суткам и значимым, но отсроченным улучшением лишь к концу четвёртой недели эксперимента. Результаты оценки неврологического статуса по шкале Гарсия в экспериментальных группах при моделировании ГИ представлены на Фиг. 1. Наблюдаемое к 4-й неделе улучшение является в значительной степени результатом естественных, но медленных и ограниченных компенсаторных механизмов организма, и обосновывает необходимость применения нейропротективных или нейрорегенеративных вмешательств для достижения более выраженного и раннего функционального восстановления. В группе «proBDNF в/в до ГИ» выявлены достоверно отличающиеся значения по шкале Гарсия уже на 3-и

сутки (16,000 [15,000;17,000] баллов против 14,091±1,375 баллов на 1е сутки, p=0,030 критерий знаковых рангов Вилкоксона). Нейропротективный эффект предварительного в/в введения AAV-proBDNF достигал максимальной выраженности на 21-е сутки (20 [19;20] баллов против 16 [15;16] баллов в групе PBS, p<0,001 U-Манна-Уитни), демонстрируя ранний и устойчивый нейропротективный потенциал.

Таким образом, в предлагаемом способе однократное внутривенное введение препарата на основе аденоассоциированного вирусного вектора AAV-proBDNF в дозе $2*10^{11}$ ед. в объеме 0,2 мл предварительно за 4 недели до моделирования ГИ приводит к выраженной коррекции неврологического дефицита при ГИ у мышей CD1, что подтверждается результатами оценки неврологического статуса по шкале Гарсия на 14, 21 и 28 сутки после моделирования ГИ.

```
<?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="BDNF.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2026-02-23">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>1234</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2026-02-23</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>2312134</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>123</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2026-02-03</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="ru">Анна Александровна
Пересыпкина</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>Peresypkina Anna
Alexandrovna</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="en">BDNF</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>9</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>584</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..584</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier id="q2">
         <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
         <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
       </INSDFeature_quals>
      </INSDFeature>
     </INSDSeq_feature-table>
     <INSDSeq_sequence>gacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcatt
agttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccc
aacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccatt
gacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaag
tacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgg
gactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagt
acatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgg
gagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaa
atgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagct</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
   </SequenceData>
   <SequenceData sequenceIDNumber="2">
    <INSDSeq>
     <INSDSeq_length>54</INSDSeq_length>
     <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
     <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
     <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
       <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
       <INSDFeature_location>1..54</INSDFeature_location>
       <INSDFeature_quals>
        <INSDQualifier>
         <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
         <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q4">
         <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
         <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
       </INSDFeature_quals>
      </INSDFeature>
     </INSDSeq_feature-table>
     <INSDSeq_sequence>atgaccatccttttccttactatggttatttcatactttggttgcatga
aggct</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
   </SequenceData>
   <SequenceData sequenceIDNumber="3">
    <INSDSeq>
     <INSDSeq_length>357</INSDSeq_length>
     <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
     <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..357</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q6">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cactctgaccctgcccgccgaggggagctgagcgtgtgtgacagtatta
gtgagtgggtaacggcggcagacaaaaagactgcagtggacatgtcgggcgggacggtcacagtccttga
aaaggtccctgtatcaaaaggccaactgaagcaatacttctacgagaccaagtgcaatcccatgggttac
acaaaagaaggctgcaggggcatagacaaaaggcattggaactcccagtgccgaactacccagtcgtacg
tgcgggcccttaccatggatagcaaaaagagaattggctggcgattcataaggatagacacttcttgtgt
atgtacattgaccattaaaaggggaaga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q8">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tacccatacgatgttccagattacgct</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>

<SequenceData sequenceIDNumber="5">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>225</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..225</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q10">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgcc
ttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgt
ctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagaca
atagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatgg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q12">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

```
   <INSDSeq_sequence>ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtc
gggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcac
taggggttcct</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q14">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctc
gctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgag
cgagcgcgcag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>861</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..861</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q16">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

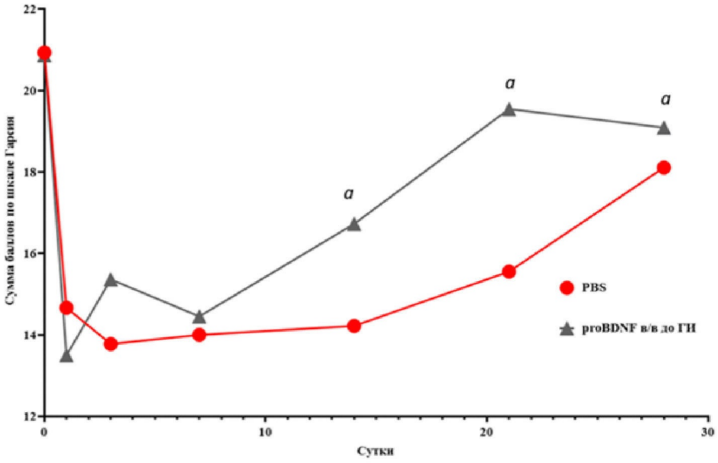
```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>atgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattccctttttgcggcat
tttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgc
acgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgt
tttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaag
agcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagca
tcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggcc
aacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatg
taactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgat
gcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaa
caattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggct
ggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccaga
tggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaataga
cagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>589</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..589</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q18">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaa
ccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggct
tcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactc
tgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcg
tgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggtt
cgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgaga
aagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagag
cgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgac
```

ttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>

(57) Формула изобретения

Способ коррекции неврологического дефицита при геморрагическом инсульте с использованием препарата на основе аденоассоциированного вируса, несущего нейротрофический фактор proBDNF, в эксперименте, включающий использование самцов лабораторных грызунов и моделирование внутримозгового кровоизлияния в правую гемисферу головного мозга с коррекцией неврологического дефицита, отличающийся тем, что эксперимент проводят на мышах CD1, аденоассоциированный вирусный вектор AAV-proBDNF вводят однократно в латеральную хвостовую вену за 4 недели до моделирования стриатокапсулярного внутримозгового кровоизлияния в дозе $2 \cdot 10^{11}$ ед., а оценку неврологического статуса экспериментальных животных проводят с использованием шкалы Гарсия через 24 часа после моделирования геморрагического инсульта, а также на 3, 7, 14, 21 и 28 сутки.

1



Примечания: [a] – p<0,05 при сравнении с группой PBS

Фиг.1