



(51) МПК
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 48/005 (2023.05); *C12N 15/85* (2023.05); *A61P 21/00* (2023.05); *A01K 2267/0306* (2023.05); *C12N 2015/8536* (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022134016, 23.12.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.12.2022

Дата регистрации:
16.10.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.12.2022

(45) Опубликовано: 16.10.2023 Бюл. № 29

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, ФГАОУ
 ВО НИУ "БелГУ", начальнику отдела ИС,
 Токтаревой Т.М.

(72) Автор(ы):

Корокин Михаил Викторович (RU),
 Покровский Михаил Владимирович (RU),
 Дейкин Алексей Васильевич (RU),
 Солдатов Владислав Олегович (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. RU 2527073 C2
 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
 ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НЕКСТГЕН"),
 27.08.2014. RU 2761264 C2 (РИСЕРЧ
 ИНСТИТЮТ ЭТ НЭШНУАЙД
 ЧИЛДРЕН'С ХОСПИТАЛ), 06.12.2021.
 СТАРОСТИНА И. Г. и др. (см. прод.)

(54) Способ коррекции миодистрофии с использованием плазмидной ДНК у дисферлин-дефицитных мышей

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в
 частности к экспериментальной фармакологии и

генетическим технологиям. Предложен способ
 коррекции миодистрофии с использованием

плазмидной ДНК у дисферлин-дефицитных мышей. Самцам дисферлин-дефицитных мышей В6.А/J-Dysf^{prmd} однократно вводят препарат ПЛ-ДИСФ-рМНСК7 на основе плазмидной ДНК дисферлина с промотором рМНСК7 в концентрации 0,5 г/л в объеме 100 мкл, по 50 мкл

в правую и левую m. tibialis anterior. Коррекцию миодистрофии подтверждают результатами теста «Вертикальный шест» через 30 дней после введения ПЛ-ДИСФ-рМНСК7. Изобретение позволяет расширить арсенал лекарственных средств для эффективного лечения дисферлинопатий. 3 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

Создание рекомбинантного аденовируса, кодирующего кодон-оптимизированный ген дисферлина, и анализ экспрессии рекомбинантного белка в культуре клеток in vitro. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, Том VII, no.3, с.25-28. 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. ROCHE J. A. et al. Distinct effects of contraction-induced injury in vivo on four different murine models of dysferlinopathy. J Biomed Biotechnol. 2012, v.2012, Article ID 134031, p.1-11, doi: 10.1155/2012/134031. ZAVALJEVSKI M. et al. Design of Tissue-specific Regulatory Cassettes for High-level rAAV-mediated Expression in Skeletal and Cardiac Muscle. Molecular Therapy. 2007, v.15, no.2, p.320-329. POTTER R. A. et al. Dose-Escalation Study of Systemically Delivered rAAVrh74.MНСК7.micro-dystrophin in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. Hum Gene Ther. 2021 Apr; v.32, no.7-8, p.375-389. doi: 10.1089/hum.2019.255.

R U 2 8 0 5 3 5 7 C 1

R U 2 8 0 5 3 5 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 48/005 (2023.05); *C12N 15/85* (2023.05); *A61P 21/00* (2023.05); *A01K 2267/0306* (2023.05); *C12N 2015/8536* (2023.05)

(21)(22) Application: **2022134016, 23.12.2022**(24) Effective date for property rights:
23.12.2022Registration date:
16.10.2023

Priority:

(22) Date of filing: **23.12.2022**(45) Date of publication: **16.10.2023 Bull. № 29**

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),
Soldatov Vladislav Olegovich (RU),
Korokina Liliya Viktorovna (RU),
Peresyphkina 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 FOR CORRECTING MUSCULAR DYSTROPHY USING PLASMID DNA IN DYSFERLIN-DEFICIENT MICE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention is related to experimental pharmacology and genetic technologies. A method for correcting muscular dystrophy using plasmid DNA in dysferlin-deficient mice is proposed. Male dysferlin-deficient B6.A/J-Dysf^{prmd} mice are administered a single dose of the drug "ПЛ-ДИСФ-рМНСК7" based on plasmid dysferlin DNA with the "рМНСК7"

promoter at a concentration of 0.5 g/l in a volume of 100 mcl, 50 mcl in the right and left m. tibialis anterior. Correction of myodystrophy is confirmed by the results of the "Vertical pole" test 30 days after the administration of "ПЛ-ДИСФ-рМНСК7".

EFFECT: invention makes it possible to expand the arsenal of drugs for the effective treatment of dysferlinopathies.

1 cl, 3 tbl, 1 ex

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

По известным литературным источникам - дисферлинопатии включают группу миопатий, которые имеют один и тот же генетический дефект DYSF в хромосоме 2p13 человека. В 1998 году было обнаружено, что миопатия (миодистрофия) Миоши имеет мутацию в гене дисферлина [Urtizberea, J. A., Bassez, G., Leturcq, F., Nguyen, K., Krahn, M., & Levy, N. (2008). Dysferlinopathies. *Neurology India*, 56(3), 289-297]. Сообщалось, что средний возраст начала дисферлинопатии составил $20,3 \pm 5,5$ лет в когорте из 29 пациентов из 12 семей, имеющих одну и ту же гомозиготную мутацию [Patel, N. J., Van Dyke, K. W., & Espinoza, L. R. (2017). Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2B and Miyoshi Presentations of Dysferlinopathy. *The American journal of the medical sciences*, 353(5), 484-491]. Дефицит дисферлина также был связан с такими фенотипами, как дистальная миопатия с поражением передней большеберцовой мышцы [Paradas, C., González-Quereda, L., De Luna, N., Gallardo, E., García-Consuegra, I., Gómez, H., Cabello, A., Illa, I., & Gallano, P. (2009). A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscular disorders* : NMD, 19(1), 21-25].

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].

Плазмидные векторы показали себя как наиболее безопасные и эффективные средства доставки генетического материала внутрь клетки как *ex vivo* так и *in vivo* [Kessler, J. A., Shaibani, A., Sang, C. N., Christiansen, M., Kudrow, D., Vinik, A., Shin, N., & VM202 study group (2021). Gene therapy for diabetic peripheral neuropathy: A randomized, placebo-controlled phase III study of VM202, a plasmid DNA encoding human hepatocyte growth factor. *Clinical and translational science*, 14(3), 1176-1184; Vonderheide, R. H., Kraynyak, K. A., Shields, A. F., McRee, A. J., Johnson, J. M., Sun, W., Chintakuntlawar, A. V., Pawlicki, J., Sylvester, A. J., McMullan, T., Samuels, R., Kim, J. J., Weiner, D., Boyer, J. D., Morrow, M. P., Humeau, L., & Skolnik, J. M. (2021). Phase 1 study of safety, tolerability and immunogenicity of the human telomerase (hTERT)-encoded DNA plasmids INO-1400 and INO-1401 with or without IL-12 DNA plasmid INO-9012 in adult patients with solid tumors. *Journal for immunotherapy of cancer*, 9(7), e003019].

Использование генетических моделей нейродегенеративных заболеваний человека, получаемых путем модификации и/или редактирования генома лабораторных животных, и воспроизводящих ключевые звенья патогенеза заболевания является незаменимым звеном исследований, направленных на выявление молекулярных мишеней для разработки комплексной терапии и идентификацию геномных локусов, редактирование которых приводит к реверсии патологического фенотипа [Gitler, A. D., Dhillon, P., & Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech*, 10(5), 499-502].

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 аутологичных клеток, например гемопоэтических и их более дифференцированных производных, мезенхимальных, сосудисто-стромальной фракции, мезангиобластов, миобластов, миосателлитоцитов и др.

Основным недостатком способа является то, что аденовирус обладает более высокой иммуногенностью по сравнению с плазмидным вектором. Преимущество использования плазмидной ДНК в генной терапии можно объяснить лучшим профилем безопасности невирусных векторов по сравнению с вирусными [Stadler, J., Lemmens, R., & Nyhammar, T. (2004). Plasmid DNA purification. *The journal of gene medicine*, 6 Suppl 1, S54-S66]. Помимо этого, в данном способе не приведены режимы введения и дозы препарата при конкретных показаниях.

Наиболее близким по существу предлагаемого изобретения (прототипом) 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 аденоассоциированного вируса (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. Внутримышечная инъекция двух рекомбинантных AAV в мышиную модель дисферлинопатии приводила к экспрессии полноразмерного дисферлина. Инъекции приводили к улучшению гистологической картины мышечной ткани, сокращению числа некротических волокон, восстановлению репарации мембраны и глобальному улучшению двигательных функций.

Недостатком данного способа является то, что вирусные векторы, в частности AAV менее безопасны по сравнению с невирусными, к которым относят плазмидные векторы [Stadler, J., Lemmens, R., & Nyhammar, T. (2004). Plasmid DNA purification. *The journal of gene medicine*, 6 Suppl 1, S54-S66]. Помимо этого, недостатком способа является необходимость одновременного введения двух генетических конструкций, обусловленная ограниченной способностью векторов на основе AAV нести большие вставки трансгенной ДНК.

Задачей настоящего изобретения является создание эффективного способа коррекции миодистрофии с использованием плазмидной ДНК у дисферлин-дефицитных мышей. Предлагаемое изобретение позволит расширить арсенал лекарственных средств для эффективного лечения дисферлинопатий.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ коррекции миодистрофии с использованием плазмидной ДНК у дисферлин-дефицитных мышей, лишенный недостатков прототипа, а именно высокой иммуногенности аденовируса, с приведением доз и режима введения препарата ПЛ-ДИСФ-рМНСК7 в эксперименте на дисферлин-дефицитных мышцах, и недостатков аналога, касающихся профиля безопасности и ограниченной способности векторов AAV нести большие вставки трансгенной ДНК.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ коррекции миодистрофии с использованием плазмидной ДНК у дисферлин-дефицитных мышей,

включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-*Dysf^{prmd}* и однократное введение геннотерапевтического препарата в правую и левую *musculus tibialis anterior* с оценкой мышечной функции через 30 дней после введения препарата, причем коррекцию миодистрофии проводят препаратом ПЛ-ДИСФ-рМНСК7 на основе плазмидной ДНК с промотором рМНСК7 в объеме 100 мкл, по 50 мкл в правую и левую *m. tibialis anterior*, подтверждаемый результатами теста «Вертикальный шест».

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что однократное введение ПЛ-ДИСФ-рМНСК7 в объеме 100 мкл (концентрация 0,5 г/л), по 50 мкл в правую и левую *m. tibialis anterior*, приводит к выраженной коррекции миодистрофии у дисферлин-дефицитных мышей B6.A/J-*Dysf^{prmd}*, что подтверждается достоверным уменьшением времени поворота и времени спуска у мышей B6.A/J-*Dysf^{prmd}*, получавших ПЛ-ДИСФ-рМНСК7 по сравнению с нелечеными животными ($p < 0,05$) в тесте «Вертикальный шест», так как ПЛ-ДИСФ-рМНСК7 приводит к выраженной экспрессии функционально активного дисферлина за счет доставки правильной копии кДНК дисферлина в миоциты.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛ-ДИСФ-рМНСК7

Пример 1

Дизайн и синтез олигонуклеотидов и генетических конструкций

Дизайн осуществлялся с помощью онлайн ПО Benchling, синтез олигонуклеотидов и праймеров осуществлялся Евроген (Москва, Россия), синтез плазмидных векторов де-ново осуществлялся GenScript Biotech BV (Нидерланды) с помощью технологии синтеза длинных последовательностей ДНК GenBrick.

Клонирование кДНК дисферлина было выполнено с помощью нуклеаз EcoRV и HindIII/NotI по ранее отработанной технологии.

Наработка и проверка плазмидных конструкций

Для выполнения работ использовали заранее подготовленные бактериальные стоки по 500 мкл каждый. 4 мл клеточной культуры использовали для выделения плазмидной ДНК и постановки аналитического рестрикционного анализа.

С помощью набора Plasmid Miniprep BC021 (Евроген) проводили выделение плазмиды по установленному производителем протоколу Набор Plasmid Miniprep BC021 (Евроген, РФ). Полученную плазмиду использовали для постановки рестрикции (таблица 1).

Таблица 1

Состав реакционной смеси для проведения аналитической рестрикции.

Для плазмиды DysF1 и DysF2		Для плазмиды DysF0	
pDNA	250-500нг	pDNA	250-500нг
Hind III (FD0504)	0,3 мкл	BglII (FD0083)	0,3 мкл
NotI (FD0593)	0,3 мкл	XhoI (FD0694)	0,3 мкл
10x GB buffer (B72)	1 мкл	10x GB buffer (B72)	1 мкл
Очищенная вода	до 10 мкл	Очищенная вода	до 10 мкл

Полученный рестрикционный микс инкубировали в термостате 30-60 мин при 37°C, далее наносили на 1% агарозный гель (250-500 нг плазмиды на лунку и маркер длин NL001 250 нг на лунку) и проводили электрофорез в 1x буфере TAE при 120В в течение 30-60 мин в присутствии красителя этидия бромида.

Полученные результаты детектировали визуально с помощью трансиллюминатора при длине волны 365 нм и сравнивали с теоретической картой плазмиды.

Плазмидный вектор несет регуляторную последовательность промотора МНСК7.

Наименование характеристики	Целевое значение
5 10 15 20 25 Регуляторная последовательность (промотор МНСК7)	СТАГААГСТГСАТГТСТААГСТАГАСССТТСАГАТТАА АААТААСТГАГГТААГГГСССТГГГТАГГГГАГГТГГТГ ТГАГАСГСТССТГТСТСТССТСТАТСТГСССАТСГГССС ТТТГГГГАГГААТГТГСССААГГАСТААААААААГ ГССАТГГАГССАГАГГГГССАГАГССААССАТТТСА ТГГГСАААСССТТГГГССССТГСТГТСТАГАТГСССАС ТАССГГТСТАГГСТГСССАТГТААГГАГССААГСССТГ ГГГАСАСССАГАТГССТГГТТААТТААСССАГАСА ТГТГГСТГССССССССССССААСССТГСТГСССТТАА АААТААСССТГТСССТГГТГГАТССССТГСАТГСГААГ АТСТТЦГААСААГГСТГТГГГГГАСТГАГГССАГГСТГ ТААСАГГСТТГГГГССАГГГСТТААСТГСССТГГГА СТСССААГАТАТАСТГТТССАТГТТСССГССААГГСС САГСТГТСССССГССАГСТАГАСТСАГСАСТТАГТТАГ ГААССАГТГАГСААГТСАГСССТТГГГССАГСССАТАС ААГССАТГГГГСТГГССААГСТГСАСГСССТГГГТССГ ГГГТГССАСГГТГСССГССААССАГСТГАААГСТСА ТСТГСТСТСАГГССССТСССТГГГССАГССССТССТ ГГСТАГТСАСССТГТАГГСТССТСТАТААСССАГ ГГСАСАГГГСТГСССТСАТТСТАССАССАСТССА ГСАСГАСТ

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛ-ДИСФ-рМНСК7

30 Эксперименты проведены на 30 мышах-самцах В6.А/J-*Dysf^{prmd}*, Stock No: 012767, Jackson Laboratory, массы которых приведены в таблице 2. Каждая группа включала 10 крыс. Мыши были редеривированы в SPF зону экспериментально-биологической клиники НИУ «БелГУ», рандомизированы в соответствии с массой и использованы для исследования специфической фармакологической активности ПЛ-ДИСФ-рМНСК7.

35 1 группа - положительный контроль (шифр ДТ) - мыши дикого типа, получающие физиологический раствор внутримышечно в объеме 100 мкл (по 50 мкл в правую и левую *M. tibialis anterior*);

40 2 группа - отрицательный контроль (шифр ДИСФ) - дисферлин-дефицитные мыши с генотипом В6.А/J-*Dysf^{prmd}*, получающие физиологический раствор внутримышечно в объеме 100 мкл (по 50 мкл в правую и левую *M. tibialis anterior*);

3 группа - дисферлин-дефицитные мыши, получающие препарат ПЛ-ДИСФ- рМНСК7 (шифр ПЛ1- препарат на основе плазмидной ДНК с промотором рМНСК7) в объеме 100 мкл (по 50 мкл в правую и левую *M. tibialis anterior*).

45

Таблица 2

Популяция животных, подготовленная для исследования специфической фармакологической активности препарата ПЛ-ДИСФ-рМНСК7, г

№	ДТ	ДИСФ	ПЛ1
1	25,5	24,0	25,7
2	26,5	26,5	22,8
3	23,5	21,1	27,8
4	21,2	20,6	22,8
5	20,6	22,5	23,4
6	23,4	22,1	26,3
7	24,1	24,8	25,2
8	25,8	21,2	21,8
9	23,9	20,0	22,0
10	22,0	25,1	24,2

О выраженности эффекта судили по мышечной функции через 30 дней после однократной инъекции препарата. Для этого проводили тест «Вертикальный шест» [Kovalzon, V. M., Ushakova, N. A., Bastrakov, A. I., Kozlova, A. A., Ambaryan, A. V., Shevchenko, V. P., Nagaev, I. Y., & Pavlov, D. S. (2016). Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova, 102(4), 436-441] в нашей модификации.

Тест «Вертикальный шест». Установка представляет собой шест с шероховатой поверхностью длиной 50-55 см, диаметром 10 мм, на устойчивой подставке с ограничителем на верхушке (например, кусок картона 7-10x7-10 см или рука исследователя) для предотвращения возможности животного перелезть через конец шеста. Данный тест используется для оценки координации движений и равновесия. Мышей раз в две недели помещали мордой вверх на верхушку шеста с подставкой, установленной в домашней клетке для провоцирования желания животного добраться до основания. Фиксировались время поворота (Tturn) и время спуска (Tdown) в клетку. Каждому животному давалось три попытки, средние значения Tturn и Tdown использовали для анализа данных.

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

В результате исследования установлено, что в тесте «Вертикальный шест» у животных в группе ДИСФ статистически значимо, в сравнении с животными дикого типа, увеличивалось время поворота (на 67,7%, $p < 0,05$) и время спуска с шеста (на 21,7%, $p < 0,05$), что свидетельствует о развитии симптоматической стадии миодистрофии, вызванной дисферлин-дефицитным состоянием. Статистически значимое, в сравнении с группой ДИСФ, уменьшение как времени поворота (на 23,9%, $p < 0,05$), так и времени спуска (на 23,2%, $p < 0,05$) установлено как в группе животных ПЛ1 (таблица 3).

Таблица 3

Результаты исследования фармакологической активности ПЛ-ДИСФ-рМНСК7 в тесте «Вертикальный шест» ($M \pm m$), с

№ п/п	Экспериментальные группы	Время поворота	Время спуска
1	ДТ (n=10)	1,482	3,561
2	ДИСФ (n=10)	2,485	4,335
3	ПЛ1 (n=10)	1,891	3,330

Примечания: * – $p < 0,05$ в сравнении с группой ДТ; ** – $p < 0,05$ в сравнении с группой ДИСФ.

Таким образом, в предлагаемом способе однократное введение плазмидной ДНК с промотором рМНСК7 в объеме 100 мкл в концентрации 0,5 г/л, по 50 мкл в правую и левую *m. tibialis anterior*, приводит к выраженной коррекции миодистрофии у дисферлин-дефицитных мышей В6.А/J-*Dysf^{prmd}*, что подтверждается результатами теста «Вертикальный шест» через 30 дней после введения ПЛ-ДИСФ-рМНСК7.

(57) Формула изобретения

Способ коррекции миодистрофии с использованием плазмидной ДНК у дисферлин-дефицитных мышей, включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышей В6.А/J-*Dysf^{prmd}* и однократное введение геннотерапевтического препарата в правую и левую *musculus tibialis anterior* с оценкой мышечной функции через 30 дней после введения препарата, отличающийся тем, что коррекцию миодистрофии проводят препаратом ПЛ-ДИСФ-рМНСК7 на основе плазмидной ДНК дисферлина с промотором рМНСК7 в концентрации 0,5 г/л в объеме 100 мкл, по 50 мкл в правую и левую *m. tibialis anterior*, подтверждаемый результатами теста «Вертикальный шест».