



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 48/005 (2025.08); C12N 15/85 (2025.08); A61P 21/00 (2025.08); A01K 2267/0306 (2025.08); C12N 2015/8536 (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2024139616, 26.12.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.12.2024Дата регистрации:
02.02.2026

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.12.2024

(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: RU 2821544 C1, 25.06.2024.

КУЗУБОВА Е.В. и др. Использование
двухвекторной системы на основе
аденоассоциированного вируса для генной
терапии миопатии Миоши на модели мышей
B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ. Тезисы докладов
конференции. Генетические технологии в
исследованиях природных соединений.
Всероссийская научная школа-конференция
молодых ученых и (см. прод.)

(54) Способ увеличения физической выносливости у дисферлин-дефицитных мышей в эксперименте

(57) Реферат:

Изобретение относится к экспериментальной
фармакологии и генетическим технологиям.
Предложен способ увеличения физической

выносливости у дисферлин-дефицитных мышей
в эксперименте. Самцам дисферлин-дефицитных
мышей B6.A/J-Dysf^{prmd} в/м вводят препарат на

основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном, 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. Повторно вводят препарат через 1 месяц после первого введения. Способ приводит к повышению физической выносливости, подтверждаемому результатами теста «Удержание на проволоке» через 3 месяца после первого введения препарата. 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

студентов. Владивосток 3-7 октября 2023 г. с.20. RU 2805357 C1, 16.10.2023. YAKOVLEV I. A., 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 Aug 31; 24(17): 13551, p.1-15. doi: 10.3390/ijms241713551. LOSTAL W., et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet*, 2010, v. 19, no. 10, p. 1897-907. US 20230279065 A1, 07.09.2023. RU 2527073 C2, 27.08.2014. PRYADKINA M., et al. A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb Dysferlin coding sequence. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 2015, 2, 15009, p.1-12, doi:10.1038/mtm.2015.9. POTTER R. A., et al. Systemic Delivery of Dysferlin Overlap Vectors Provides Long-Term Gene Expression and Functional Improvement for Dysferlinopathy. *Hum Gene Ther.*, 2018, v. 29, no.7, p.749-762. doi: 10.1089/hum.2017.062. GROSE W. E., et al. Homologous Recombination Mediates Functional Recovery of Dysferlin Deficiency following AAV5 Gene Transfer. *PLoS ONE*, 2012, v. 7, Iss. 6, e39233, p.1-10. ЯКОВЛЕВ И.А. и др. Двухвекторная система на основе аденоассоциированного вируса для генной терапии дисферлинопатии. *Гены & Клетки XVII, N3, Материалы V национального конгресса по регенеративной медицине, 2022, с.269-270.*

R U
2 8 5 5 4 2 3
C 1

R U
2 8 5 5 4 2 3
C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 48/005 (2025.08); *C12N 15/85* (2025.08); *A61P 21/00* (2025.08); *A01K 2267/0306* (2025.08); *C12N 2015/8536* (2025.08)

(21)(22) Application: **2024139616, 26.12.2024**(24) Effective date for property rights:
26.12.2024Registration date:
02.02.2026

Priority:

(22) Date of filing: **26.12.2024**(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 issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

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

(57) Abstract:

FIELD: experimental pharmacology; genetic technologies.

SUBSTANCE: method for increasing physical endurance in dysferlin-deficient mice in an experiment is proposed. Male dysferlin-deficient mice B6.A/J-Dysf^{prmd} are administered i/m a preparation based on adeno-associated virus of serotype 9, carrying a codon-optimised cDNA of the dysferlin gene under the control of a muscle-specific promoter in combination with a

chimeric intron, at a dose of $5 \cdot 10^{12}$ units of the virus with the DYSF gene in a volume of 50 µl into the following muscles of both hind limbs: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis. The preparation is administered again 1 month after the first administration.

EFFECT: increasing physical endurance, confirmed by the results of the "Wire hang" test 3 months after the first administration of the preparation.

1 cl, 1 tbl, 1 ex

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

По известным литературным источникам – 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]. 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]. 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].

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, мезенхимальных, сосудисто-стромальной фракции, мезангиобластов и др.

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

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

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

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

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

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.

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

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ увеличения физической 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 препарат на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном 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} с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения с оценкой физической выносливости через 3 месяца после первого введения препарата, подтверждаемый результатами теста «Удержание на проволоке».

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что в/м введение AAV9-ДИСФ-ДВ 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 мышцей B6.A/J-Dysf^{prmd} в возрасте 6 месяцев с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения приводит к повышению физической выносливости у дисферлин-дефицитных мышей, что подтверждается достоверным увеличением времени удержания на проволоке мышцей B6.A/J-Dysf^{prmd} с введением AAV9-ДИСФ-ДВ, в 2,11 раза ($p=0,0019$), по сравнению с нелечеными животными в тесте «Удержание на проволоке», так как двойные AAV векторы имеют перекрывающуюся область размером 1 т. п. н., которая служит субстратом для рекомбинации с целью создания полноразмерной кДНК дисферлина и более выраженной экспрессии полноразмерного

белка дисферлина за счет наличия химерного интрона в 5'-кассете.

СПОСОБ 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 AAV9-ДИСФ-ДВ.

Первая группа (n=10) – отрицательный контроль – дисферлин-дефицитные мыши (шифр К-) с генотипом B6.A/J-Dysf^{prmd}; вторая группа (n=10) – положительный контроль – мыши дикого типа (шифр К+); третья группа (n=14) – дисферлин-дефицитные мыши, получающие препарат AAV9-ДИСФ-ДВ в/м 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 с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения (шифр AAV 3 i/m).

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

Статистическую обработку проводили с использованием программной среды вычислений R. Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка и критерия Шпигельхальтера (библиотека normtest), оценку равенства дисперсий – с помощью критерия Левене (библиотека lawstat). В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Крускала-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 на проволоке было значительно меньше у мышей с

дисферлинопатией (группа К-) по сравнению с мышами дикого типа (группа К+), на 62,9% ($p=0,0002$), что свидетельствует о снижении физической выносливости у мышей с генотипом B6.A/J-Dysf^{prmd} в возрасте 9 месяцев. Выраженная эффективность ААВ9-ДИСФ-ДВ наблюдалась в опытной группе (ААВ 3 i/m), т.к. время удержания мышей на проволоке увеличилось в 2,11 раза ($p=0,0019$), чем в группе К-, при этом не отличаясь от значений группы К+ ($p\geq 0,9999$), результаты исследования фармакологической активности ААВ9-ДИСФ-ДВ в тесте «Удержание на проволоке» ($M\pm m$), с представлены в таблице 1.

Таблица 1

№ п/п	Экспериментальные группы	Время падения
1	К- (n=10)	21,90±3,053 ^y
2	К+ (n=10)	59,00±6,177 ^x
3	ААВ 3 i/m (n=14)	46,29±2,864 ^x

Примечания: ^x – $p<0,05$ в сравнении с группой К-; ^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 в/м введение ААВ9-ДИСФ-ДВ в дозе $5*10^{12}$ ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis мышцей B6.A/J-Dysf^{prmd} в возрасте 6 месяцев с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения приводит к увеличению физической выносливости в эксперименте на дисферлин-дефицитных мышцах, что подтверждается результатами теста «Удержание на проволоке» через 3 месяца после первого введения ААВ9-ДИСФ-ДВ.

(57) Формула изобретения

Способ увеличения физической выносливости у дисферлин-дефицитных мышцей в эксперименте, включающий использование самцов дисферлин-дефицитных мышцей B6.A/J-Dysf^{prmd} и введение двухвекторного препарата на основе аденоассоциированного вируса, отличающийся тем, что вводят препарат на основе аденоассоциированного вируса 9 серотипа, несущего кодон-оптимизированную кДНК гена дисферлина под управлением мышцеспецифичного промотора в комбинации с химерным интроном, в дозе $5*10^{12}$ ед. вируса с геном DYSF в объеме 50 мкл в следующие мышцы обеих задних конечностей: m. vastus lateralis, m. tibialis anterior, m. gastrocnemius lateralis мышцей B6.A/J-Dysf^{prmd} с повторным введением препарата через 1 месяц после первого введения с оценкой физической выносливости через 3 месяца после первого введения препарата, подтверждаемой результатами теста «Удержание на проволоке».