



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119032** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/07 (2006.01)

A61K 31/155 (2006.01)

A61K 31/223 (2006.01)

A61K 31/225 (2006.01)

A61K 31/221 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 04292	(72) Винахідник(и):	Перрон Ерве (FR), Фірузі Реза (FR), Кьюрі Патрік (DE), Фокар Рафаель (FR), Мадейра Александра (FR), Жоану Жюлі (FR)
(22) Дата подання заявки:	01.10.2013	(73) Власник(и):	ЖЕНЕРО СА, Chemin du Pré-Fleuri, 3, 1228 Plan-Les-Ouates, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.04.2019	(74) Представник:	Кислиця Тетяна Олегівна, реєстр. №425
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/708 779, 61/746 792	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2010003977 A1, 14.01.2010 US 2008038279 A1, 14.02.2008 Kremer David et al: "The Complex World of Oligodendroglial Differentiation Inhibitors", Annals of neurology, vol. 69, no. 4, April 2011, P. 602-618 Antony Joseph M et al: "Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination", Nature neuroscience, Nature America, INC, US, vol. 7, no. 10, 1 October 2004, P. 1088-1095 Schichel T et al: "The role of the Multiple Sclerosis Associated Retrovirus (MSRV) envelope protein (Env) on oligodendroglial homeostasis and differentiation", 17 June 2011, [Інтернет-публікація], URL: http://www. medrsd.hhu.de/fileadmin/redaktion/Fakultaeten/ Medizinische_Fakultaet/MedRSD/Doktorandenkongress/ Doktorandenkongress_2011/Kongress2011- Abstractband.pdf (знайдено 07.17.2017)
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	02.10.2012, 28.12.2012		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.06.2015, Бюл.№ 12		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.04.2019, Бюл.№ 8		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2013/070452, 01.10.2013		

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ БЛОКАДИ РЕМІЄЛІНІЗАЦІЇ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ, ЯКІ ПОВ'ЯЗАНІ З ЕКСПРЕСІЄЮ БІЛКА ОБОЛОНКИ HERV-W

UA 119032 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується фармацевтичної композиції для профілактики і/або лікування знову виявленого пошкоджуючого механізму, що блокує здатність відновлення ендogenous мієліну зрілої нервової системи (НС) при захворюваннях, пов'язаних з експресією білка оболонки (ENV, envelope protein) HERV-W (human endogenous retrovirus, ендogenous ретровірус типу W людини), а саме його підтипу MSRV (multiple sclerosis-associated retrovirus, ретровірус, асоційований з розсіяним склерозом).

Область винаходу

Даний винахід належить до інноваційних сполук і композицій для профілактики і/або лікування нововиявленого ушкоджуючого механізму, що блокує здатність відновлення ендогенного мієліну в зрілій нервовій системі (НС) при захворюваннях, які пов'язані з експресією білка оболонки (ENV, envelope protein) HERV-W (human endogenous retrovirus, ендогенний ретровірус типу W людини), зокрема, його підтипу MSRV (multiple sclerosis-associated retrovirus, ретровірус, асоційований з розсіяним склерозом).

Даний новий терапевтичний підхід поєднує в собі інгібування верхніх патогенних впливів Env на клітини попередники олігодендроцитів (OPCs, oligodendrocyte precursor cells) разом з інгібуванням нищерозміщених ефektorів патогенності Env на диференціацію OPC (NO радикали), які, як в даний час показано, блокують ремієлінізацію при HERV-W асоційованих захворюваннях, що впливають на нервову систему.

Даний винахід відноситься до терапевтичних композицій, які містять (i) принаймні один ліганд анти-HERV-W Env, і/або (ii) принаймні один лікарський засіб, який інгібує вільні радикали окису азоту (NO, Nitric Oxide), що застосовуються для профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації при захворюваннях, які пов'язані з експресією білка оболонки (ENV) HERV-W, зокрема його підтипу MSRV.

Композиція, при якій поєднані як ліганд, так і лікарський засіб, який інгібує NO, впливає на вищерозміщений індуктор Env, так само як і на нищерозміщені NO ефektorи, в вищеописаному процесі, який викликає блокаду ремієлінізації при ураженнях НС.

Крім того, синергічна дія двох типів сполук (націлених на Env і NO, відповідно) підвищує швидкість і ефективність терапії у пацієнтів з не-ремієлінізуючими ураженнями, які викликані активацією HERV-W (зокрема, асоційованих з MSRV підтипом, який виділений як частинка віріонів з клітин MS¹) і експресією його Env білка в нервовій системі.

Докладний опис винаходу

У відповідності з першим аспектом, даний винахід відноситься до ліганду анти-HERV-W Env, що застосовується для профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації при хворобах, які пов'язані з експресією білка оболонки (ENV) HERV-W, зокрема його підтипу MSRV.

У даному винаході, терміни "блокада диференціювання" або "блокада ремієлінізації" застосовують для узагальнення нещодавно виявленого явища, що складається в (i) інгібуванні диференціації клітин попередників олігодендроцитів (OPCs, oligodendrocyte precursor cells), яке викликано білком оболонки HERV-W (зокрема MSRV підтипом), (ii) в кінцевій продукції NO з OPCs, і (iii) кінцевому інгібуванні продукції мієліну OPCs, як описано в Прикладі 1.

Хвороби, пов'язані з експресією білка оболонки (ENV) HERV-W, зокрема його підтипу MSRV, визначають як HERV-W асоційовані захворювання, що вражають нервову систему, які

переважно є, але не обмежуються ними, розсіяним склерозом (MS, multiple sclerosis), переважно рецидивуючим ремітуючим розсіяним склерозом (RRMS, remitting-relapsing multiple sclerosis), прогресуючим розсіяним склерозом, таким як вторинний прогресуючий розсіяний склероз (SPMS, secondary progressive multiple sclerosis) або первинний прогресуючий розсіяний склероз (PPMS, primary progressive multiple sclerosis), хронічною запальною демієлінізуючою полінейропатією (CIDP², chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), психічними розладами, такими як шизофренія або біполярні розлади⁶, для яких також описано пошкодження мієліну³⁻⁵.

Зазвичай, ураження при розсіяному склерозі (MS) пов'язані з імунно-опосередкованою втратою олігодендроцитів і мієлінових оболонок при пошкодженні аксонів. Так само описано вплив на імунні клітини, який опосередкований білком оболонки (ENV) ретровірусу, що асоційований з розсіяним склерозом (MSRV, Multiple Sclerosis associated retrovirus) з HERV-W сімейства ендогенних ретровірусів, в асоціації з запальними ураженнями нервової системи (НС)⁷. Однак, безпосередня патогенність MSRV-Env на гліальні клітини, що включає блокаду ремієлінізації бляшок MS клітинами попередників олігодендроцитів (OPC), раніше не була відома і ніколи не була показана.

Відповідно до одного аспекту даного винаходу, інгібування верхніх патогенних впливів Env на клітини попередники олігодендроцитів (OPCs) здійснюється за рахунок ліганду анти-HERV-W Env. Ліганд анти-HERV-W Env за даним винаходом визначається його здатністю зв'язуватися з білком Env.

Термін "зв'язування" або "приєднання" ліганду означає щонайменше тимчасову взаємодію або об'єднання з антигеном-мішенню, наприклад ENV, що включає фрагменти, що містять епітоп.

Згідно з даним винаходом, HERV-W ENV означає білок, який кодується геном env будь-якого члена родини HERV-W, в тому числі підтипу MSRV, як визначено з послідовностей, які визначені у РНК ретровірусних частинок з MS^{14, 27}.

Ліганд за даним винаходом також може бути визначений, як такий, що міститься всередині рекомбінантного білка scFv (single-chain fragment of variable region, одноланцюговий фрагмент варіабельної області), Fab-фрагменти (fragment antigen binding, ділянка зв'язування антигену), антитіла, при цьому зазначене антитіло може бути поліклональним, моноклональним, олігоклональним, химеризованим, синтетичним, або гуманізованим, або людським антитілом. У конкретному аспекті винаходу, антитіло, що містить ліганд, є гуманізованим або людським Ig (імуноглобулін) G, і, більш переважно IgG1 або IgG4.

Більш конкретно, ліганд за даним винаходом містить щонайменше один, і більш переважно кожен з ділянок, які визначають комплементарність (CDRs, complementary-determining regions), що мають амінокислотні послідовності SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 і SEQ ID No. 6.

Вищезгаданий ліганд містить щонайменше один, і більш переважно, кожен з ділянок, які визначають комплементарність (CDRs), які кодуються SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30.

Як зазначено вище, блокада ремієлінізації також призводить до продукції NO клітинами OPC. Згідно з подальшим аспектом даний винахід також відноситься до лікарського засобу, який інгібує радикал окису азоту, що застосовується для профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації при захворюваннях, які пов'язані з експресією білка оболонки (ENV) HERV-W, зокрема його підтипу MSRV.

Хвороби, пов'язані з експресією HERV-W ENV визначені вище.

У більш конкретному аспекті винаходу, лікарський засіб, який інгібує вільні радикали окису азоту, або лікарський засіб, який інгібує NO є будь-яким лікарським засобом, який може інгібувати біологічний вплив NO молекул, які також називають NO радикалами. Лікарський засіб, який інгібує NO вибирають з N⁹-нітро-L-аргінін метилового ефіру (L-NAME), S-метил-ізотіосечовини (SMT), фумарової кислоти і диметилфумарату (DMF).

В іншому аспекті, даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, яка об'єднує щонайменше ліганд анти-MSRV/HERV-W Env, як визначено вище, і щонайменше один лікарський засіб, який інгібує радикал окису азоту, як визначено вище. Зазначену композицію застосовують для профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації при захворюваннях, які пов'язані з експресією білка оболонки (ENV) HERV-W, зокрема його підтипу MSRV, захворювань визначених вище.

Фармацевтичний продукт, що містить ліганд анти-HERV-W Env, як визначено вище, і лікарський засіб, який інгібує окис азоту, як це визначено вище, розглядається як комбінований продукт для одночасного, роздільного або рознесеного в часі введення для профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації при захворюваннях, які пов'язані з експресією білка оболонки (ENV) HERV-W, зокрема його підтипу MSRV.

Згідно з результатами, які описані нижче на мишачих моделях експериментального алергічного енцефаломієліту (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis), що індукований Env, був показаний синергетичний ефект комбінації ліганду анти-MSRV/HERV-W Env з щонайменше однією з NO-інгібуючих молекул, порівняно з будь-яким з цих терапевтичних агентів застосовуються окремо. Навіть при призначенні окремо, лікарські засоби, які інгібують радикали окису азоту, або ліганди анти-MSRV/HERV-W Env демонструють терапевтичну ефективність при відновленні клінічного дефіциту, як відомо, що пов'язаний з ураженням мієліну в EAE⁸. Тим не менше, порівняння між (i) лікарським засобом, який інгібує радикал окису азоту або лігандом анти-MSRV/HERV-W Env і (ii) комбінацією щонайменше одного лікарського засобу, який інгібує радикали окису азоту, і щонайменше одного анти-MSRV/HERV-W Env ліганду, демонструє велику перевагу у застосуванні даної комбінації в процесі лікування.

Таким чином, відсутність запальних інфільтратів і/або пошкоджень з запальною активністю (наприклад, неактивні бляшки MS) не виключає лікування блокади ремієлінізації, яку індуковано Env у хворих. Дане особливо актуально у пацієнтів з прогресуючим MS (первинної або вторинної прогресуючої форми), яке, як відомо, призводить до численних пошкоджень без запальної активності, які довго не виявляються при магнітно-резонансній візуалізації сигналу з контрастуванням гадолінієм при більшості ушкоджень головного і спинного мозку.

Даний винахід відноситься до способу профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації при захворюваннях, які пов'язані з експресією білка оболонки (ENV) HERV-W, зокрема його MSRV підтипу, що включає введення щонайменше одного ліганду анти-MSRV/HERV-W Env людині.

У конкретному аспекті, спосіб додатково включає в себе введення щонайменше одного лікарського засобу, який інгібує радикали окису азоту.

В іншому аспекті, винахід відноситься до способу профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації при захворюваннях, які пов'язані з експресією HERV-W білка оболонки (ENV), зокрема його MSRV підтипу, що включає введення щонайменше одного лікарського засобу, який інгібує радикал окису азоту, людині.

Короткий опис графічних матеріалів

Фігура 1. Виявлення білка Env і експресія рецептора TLR4 у тканинах MS. (А, Б) Анти-Env імуногістохімія показала наявність Env білка (стрілки) в NAWM, що близька до активних хронічних уражень (Б), але не в білій речовині здорового мозку (А). (В) Olig2-позитивні OPCs в безпосередній близькості від Env-позитивних клітин мікроглії в області хронічного активного ураження. (Г-Г'') Контрольна здорова мозкова тканина з PDGFR α (рецептор до фактору росту тромбоцитів α) -позитивними OPCs, що демонструють ко-експресію TLR4 (толл-подібний рецептор 4) (стрілки). (Д-Д'') OPCs в NAWM близькі до активного ураження MS хворих, що експресують як TLR4, так і PDGFR α (стрілки). Масштабна смужка: 50 мкм.

Фігура 2. Регуляція експресії TLR4 під час OPC диференціювання. (А) Кількісна ЗТ-ПЛР, що показує прогресивну знижувальну регуляцію експресії TLR4 у процесі спонтанного диференціювання OPC щура в культурі протягом періоду дев'яти днів. Як ген для контролю експресії застосовували GAPDH. Дані показані як середнє значення \pm -стандартне відхилення, яке отримано з 3 незалежних експериментів. t-тест ($***P<0,001$). (Б, Б') Анти-TLR4 імунофарбування показало, що при подавленні TLR4, що опосередкований малими шпильковими РНК (shRNA, small-hairpin RNA), трансфектовані OPCs були позбавлені експресії TLR4 (стрілка), що говорить про специфічність антитіл. Показані OPC були зафіксовані через три дні після трансфекції, і трансфектовані клітини виявляли експресію eGFP (зелений флуоресцентний білок). Цікаво, що сусідні нетрансфектовані клітини були TLR4 позитивним. (В-Г') Репрезентативні приклади галактоцереброзидази (GalC)/TLR4 -позитивних OPC після трьох днів (В, В') і основний білок мієліну (MBP)/TLR4 - позитивні OPCs після шести днів (Г, Г'') спонтанного диференціювання в культурі. Стрілки в (Г) вказують на більш високо диференційовані OPC тільки зі зниженим рівнем експресії TLR4, таким чином, відображаючи дані про експресію генів, які показано в (А). Стрілками вказана сильна експресія менш зрілих клітин.

Фігура 3. Запальні ефекти рекомбінантного Env на культурі OPC щура. (А, Б, В) Стимулювання OPC рекомбінантним Env в розчині (А, розчинний Env), рекомбінантним Env, що зв'язаний з поверхнею (Б; Env твердий) і Env, що зв'язаний з мембраною, (В) експресованих в pVI4Env трансфектованих U343 клітинах гліобластоми, (Г-Г') призводить до сильної індукції експресії iNOS після восьми годин стимуляції в порівнянні з відповідними буферними контролями або OPC, які вирощені в присутності pVI4ctrl трансфектованих U343 клітин гліобластоми (Д-Д'). У пробі рекомбінантного Env рівень ендотоксину склав <5 EU/мл (Endotoxin Units в мл) як виміряно за допомогою тесту LAL. (Г-Д') анти-Env імуно-фарбування трансфектованих pVI4Env і pVI4ctrl U343 клітин, що демонструють поверхневу експресію Env. (Е-Ж') Олігодендрогліальна морфологія, як було оцінено шляхом O4 імуно-фарбування залишається незмінною при стимуляції зв'язаним з поверхнею рекомбінантним Env, як було показано після одного дня (Е, Е'), також як після п'яти днів (Ж, Ж') в культурі. (З) Непрямий спектрометричний аналіз супернатантів клітинної культури для вимірювання продукту розпаду NO-нітриду показав значне збільшення дозозалежних рівнів NO в пробах OPC, які стимульовані розчинним рекомбінантним Env протягом 24 год. (І-Л) Прозапальні цитокіни, такі як TNF(фактор некрозу пухлин- α , IL(інтерлейкін)-1 β і IL-6 піддаються регуляції при стимуляції поверхнево-зв'язаним рекомбінантним Env. GAPDH застосовували як контрольний ген. Дані показані як середні значення \pm - стандартне відхилення, і є 1 із 6 (А), 8 (Б), 3 (В), 3 (З) і 8 (І-К) незалежних експериментів, відповідно. t-тест ($***P<0,001$). Масштабна смужка: 50 мкм.

Фігура 4. Порівняння чутливості до HERV-W Env у незрілих (у віці одного дня -OPC) і зрілих OPCs щура (у віці семи днів; "зрілі OPCs" або олігодендроцити - OL).

Обидва типи клітин стимулювали 100 нг/мл розчинного рекомбінантного Env. Незважаючи на значну, порівняно з буферними контролями, активацію iNOS і цитокінів у відповідь на Env стимуляцію в OLs є менш вираженою порівняно з OPC. Для контролю експресії застосовували ген GAPDH. Дані представлені у вигляді середнього значення \pm - стандартне відхилення, отриманого з одного із трьох незалежних експериментів. t-тест ($***P<0,001$, $**P<0,01$, $*P<0,05$).

Фігура 5. Env залежні реакції OPC людини. (А) Стимулювання культивованих людських OPC, зв'язаним з поверхнею (твердим) і розчинним рекомбінантним (розчинним) Env, призводить до сильної індукції експресії iNOS через 24 год. стимуляції порівняно з клітинами, які оброблені

буфером. Для контролю експресії застосовували ген GAPDH. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm стандартне відхилення, отриманого з одного із трьох незалежних експериментів. t-тест ($***P < 0,001$). (Б, Б') Імунофлуоресцентне фарбування культивованих GalC позитивних OPC людини виявило сильний сигнал для TLR4 (показано після трьох днів в культурі). Масштабна смужка: 50 мкм.

Фігура 6. Експерименти по нейтралізації Env шляху. (А) Теплова інактивація рекомбінантного Env призводить до усунення індукції гену iNOS порівняно з нативним рекомбінантним Env після 8 год. стимуляції OPC. Два зразки, нативний Env і денатурований Env (Env, оброблений температурою), наносили в концентрації 1000 нг/мл. (Б, В) Зниження експресії iNOS в OPC при фармакологічному інгібуванні IRAK1/4 і TRIF, відповідно. Після етапу 2 год. попередньої інкубації з 3200 нМ інгібітора І IRAK1/4 (кіназа, асоційована з рецептором IL-1) або 50 мкМ TRIF інгібуючого пептиду OPC стимулювали зв'язаним з поверхнею (твердим) рекомбінантним Env протягом 8 год. і згодом лізували. (Г) Зниження експресії iNOS в OPC після опосередкованої антитілом блокади рецепторів TLR4. Після етапу 2 год. преінкубації з антитілом до TLR4 у концентрації 15 мкг/мл при 37 °C, OPC стимулювали твердим Env протягом 8 год. і потім лізували. Для контролю експресії застосовували ген GAPDH. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm стандартне відхилення, і отримані з одного із трьох незалежних експериментів кожен. t-тест ($***P < 0,001$, $**P < 0,01$). (Д) Збільшення ядерної локалізації NFkB після стимуляції OPC зв'язаним з поверхнею (твердим) рекомбінантним Env протягом 8 годин. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm стандартне відхилення, і отримані з одного із трьох незалежних експериментів кожен. t-тест ($***P < 0,001$). (Е-Ж') Репрезентативне NFkB імуофарбування буфера (контроль) і стимульовані Env OPCs. Масштабна смужка: 50 мкм.

Фігура 7. Генерація 3-нітротирозин (3-NT) позитивних OPCs. (А) Імунофлуоресцентне фарбування показало, що після 24 год. Env стимуляції (зв'язаний з поверхнею рекомбінантний Env) значно більше OPC експресували NO-залежний маркер нітрозильного стресу 3-NT порівняно з обробленими буфером клітинами. Як позитивний контроль був використаний S-нітросо-N-ацетилпеніциламін (SNAP), сильний NO донор. Однак, коли OPC інкубували з L-NAME, iNOS інгібуючими молекулами, у концентрації 100 мкМ протягом 30 хв при 37 °C до Env стимуляції, 3-NT позитивність була знижена до контрольного рівня. Неактивний енантіомер D-NAME не може усунути Env залежну індукцію 3-NT. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm стандартне відхилення, і впливають з одного з трьох незалежних експериментів. t-тест ($***P < 0,001$). (Б-Е") Репрезентативне анти-3-NT імуофарбування контрольних клітин (Б, Б'), Env стимульовані OPCs (В, В'), OPCs пре-інкубовані з L-NAME (Г, Г'), D-NAME (Д, Д') і OPCs, які піддаються SNAP (Е, Е'). Масштабна смужка: 50 мкм. (Ж-Ж"). Імуногістофлуоресцентне фарбування зрізів тканини NAWM MS-пацієнтів показало, що резидентні OPC (відмічені експресією їх маркера попередника PDGFR α , стрілки) можуть піддаватися нітрозивному стресу, як показала їх 3-NT позитивність.

Фігура 8. Env залежне інгібування OPC диференціювання. (А, Б) Імунофлуоресцентний аналіз, який демонструє, що після одного - трьох днів стимуляції зв'язаним з поверхнею рекомбінантним Env, значно знижене число OPC експресувало ранній мієліновий маркер CNPase, також як пізній мієліновий маркер MBP порівняно з контрольними клітинами. Дані показані у вигляді середніх значень \pm стандартне відхилення, і отримані з одного з чотирьох незалежних експериментів. t-тест ($***P < 0,001$). (В-В") і (Г-Г") демонструють репрезентативне анти-CNPase і анти-MBP імуофарбування контролю і Env стимульованих OPCs. (Д) Інкубація OPCs з 100 мкМ L-NAME у поєднанні зі зв'язаним з поверхнею рекомбінантним Env протягом трьох днів, призводить до припинення існування Env-опосередкованої блокади OPC диференціювання, як показано анти-MBP імуофарбуванням. Застосування D-NAME виявилось не в змозі врятувати експресію мієліну. Дані представлені у вигляді середніх значень \pm стандартне відхилення, і отримані з одного з чотирьох незалежних експериментів. t-тест ($***P < 0,001$, n.s. не суттєво). (Е-З') Репрезентативне MBP імуофарбування OPC, які стимульовані тільки Env, поєднанням Env і L-NAME та поєднанням Env і D-NAME, відповідно. Масштабна смужка: 50 мкм.

Фігура 9. Експресія OPC маркерів дозрівання через 24 і 72 годин стимуляції в камерах (labteks) попередньо покритих MSRV-Env. Нанесений MSRV-Env (+Env-T), індукував зниження частки CNPase позитивних OPC після 24 год. стимуляції (А), а також зниження у відсотках MBP позитивних OPC після 72 год. стимуляції (Б), порівняно з його розбавленим буфером (буфер). Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка одного експерименту оцінена в 10 повторях (від 410 до 563 порахованих клітин в групі; $*p < 0,05$ t-тест (А) і з 364 по 491 порахованих клітин в групі; $*p < 0,001$ ранговий критерій Манна-Уїтні (Б)).

Фігура 10. Експресія CNPase в OPC людини після 24 годин стимуляції MSRV-Env і GNbAC1 (гуманізоване моноклональне антитіло у порівнянні з MSRV). (А) Нанесений MSRV-Env викликає зниження відсотка CNPase позитивних OPC після 24 год. стимуляції. GNbAC1 при 50 нМ або 200 нМ повністю пригнічує ефект MSRV-Env, при обох тестованих протоколах GNbAC1 обробки (GNbAC1-A або GNbAC1-B). Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка від 2 до 8 незалежних експериментів (від 705 до 3878 порахованих клітин в групі). (Б) GNbAC1 (50 нМ або 200 нМ), які нанесені поодиночі або разом з BSA (бичачий сироватковий альбумін) (1 мкг/мл), при обох тестованих протоколах обробки GNbAC1 (GNbAC1-A або GNbAC1-B) не має ніякого впливу на відсоток CNPase позитивних OPC. Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка одного експерименту оцінена в 10 повторностях (399 до 512 порахованих клітин в групі; $p > 0,05$; однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA)).

Фігура 11. Експресія CNPase в культурі OPC людини після 24 годин стимуляції MSRV-Env і GNbAC1, які додані в культуральне середовище.

MSRV-Env (3 нМ), які розведені в клітинному культуральному середовищі, значно знижує CNPase експресію після 24 год. обробки. GNbAC1 (200 нМ) повністю інгібує даний ефект, в той час як він не показує ніякого ефекту самотійно. Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка від 2 до 4 незалежних експериментів (від 927 до 1913 порахованих клітин у групі); $*p < 0,001$ у порівнянні з буфером; однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з подальшим апостеріорним методом LSD (less significance distance, найменш значна різниця) Фішера.

Фігура 12. Експресія MBP в культурах OPC людини після 72 годин стимуляції MSRV-Env і GNbAC1. (А) Нанесений MSRV-Env (Env-T) індукує зниження у відсотках MBP позитивних OPC після 72 год. стимуляції. GNbAC1 при 50 нМ частково інгібує дію MSRV-Env, і дане інгібування є повним при 200 нМ, в обох тестованих протоколах обробки GNbAC1 (GNbAC1-A або GNbAC1-B). (Б) MSRV-Env (3 нМ), доданий в середовище клітинної культури, значно знижує експресію MBP після 72 год. обробки. GNbAC1 (200 нМ) повністю інгібує даний ефект (Б).

Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка (А) від 2 до 8 незалежних експериментів (від 924 до 4156 порахованих клітин у групі) $*p < 0,05$; $**p < 0,001$ порівняно з буфером; $\psi p < 0,001$ порівняно з Env-T; однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з подальшим апостеріорним методом LSD Фішера, і (Б) від 2 до 4 незалежних експериментів (1013 до 1834 порахованих клітин в групі; $*p < 0,001$ у порівнянні з буфером; $\psi p < 0,001$ у порівнянні з Env-T; однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з подальшим апостеріорним методом LSD Фішера).

Фігура 13. Експресія маркерів дозрівання OPC через 24 і 72 години стимуляції за допомогою нанесення MSRV-Env і GNbAC1. Нанесений MSRV-Env індукує (А) зменшення відсотка CNPase позитивних OPC людини після 24 год. стимуляції, а також (Б) зменшення у відсотках MBP позитивних OPC людини після 72 год. стимуляції. (А) GNbAC1 (200 нМ) повністю інгібує дію MSRV-Env, при обох тестованих протоколах обробки GNbAC1 (GNbAC1-A або GNbAC1-B). Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка 6 незалежних експериментів (від 2805 до 3039 порахованих клітин в групі; $*p < 0,05$ у порівнянні з буфером; $\psi p < 0,05$ у порівнянні з MSRV-Env; ранговий критерій Краскела-Уолліса ANOVA-1 з подальшим апостеріорним аналізом Стюдент-Ньюман-Кейля і (Б) від 5 до 6 незалежних експериментів (1671 до 2066 порахованих клітин на групу; $*p < 0,05$ у порівнянні з буфером; $\psi p < 0,05$ у порівнянні з MSRV-Env; ранговий критерій Краскела-Уолліса ANOVA-1 з подальшим апостеріорним аналізом критерію Данна).

Фігура 14. Інгібування дозрівання OPC людини, яке викликане MSRV-Env, повністю усувається GNbAC1. Нанесений MSRV-Env (ENV) індукує (А) зниження відсотка CNPase позитивних OPC людини після 24 год. стимуляції, а також (Б) зменшення у відсотках MBP позитивних OPC людини після 72 год. стимуляції. GNbAC1 (200 нМ) повністю інгібує MSRV-Env ефект, в обох тестованих протоколах обробок GNbAC1 (+GNbAC1 А або +GNbAC1 В). Результати виражені як відсоток CNPase (А) або MBP (Б) позитивних клітин, і є середнім значенням \pm стандартна похибка 8-14 незалежних експериментів (3600 до 6800 порахованих клітин у групі (А) і 2700 до 5800 порахованих клітин в групі (Б)) $*p < 0,05$ у порівнянні з CTRL; $\psi p < 0,05$ у порівнянні з MSRV-Env; ранговий критерій Краскела-Уолліса ANOVA-1 з подальшим апостеріорним аналізом критерію Данна.

Фігура 15. Інгібування дозрівання OPC людини, яке викликане MSRV-Env, повністю усувається GNbAC1 (нормалізовані дані). MSRV-Env наносили на скло культуральних камер перед посівом OPC. GNbAC1 (200 нМ), змішували з MSRV-Env перед нанесенням (GNbAC1-A) або інкубували на культуральних камерах, які покриті MSRV-Env (GNbAC1-B). Дані

розраховуються як відсоток (А) CNPase або (Б) MBP-позитивних клітин і виражені у вигляді відсотка зміни умовам CTRL (MSRV-Env буфер). Результати є середнім значенням \pm стандартна похибка 8-14 незалежних експериментів (від 3600 до 6800 порахованих клітин у групі (А) і від 2700 до 5800 порахованих клітин в групі (Б)). * $p < 0,05$ у порівнянні з CTRL, $^{**}p < 0,05$ у порівнянні з MSRV-ENV; ранговий критерій Краскела-Уолліса ANOVA-1 з подальшим апостеріорним аналізом критерію Данна.

Фігура 16. Кінетика клінічного показника ЕАЕ Груп А, Б, В і Е (А - необроблені ЕАЕ позитивні контролю, Б - ЕАЕ, оброблений GNbAc1 200мкг, В - ЕАЕ, оброблений L - NAME, Г - ЕАЕ, оброблений GNbAc 200 мкг + L-NAME).

Фігура 17. Кінетика клінічного показника ЕАЕ Груп А, Б, Г і Ж (А - необроблені ЕАЕ позитивні контролю, Б - ЕАЕ, оброблені GNbAc1 200 мкг, Г - ЕАЕ, оброблені SMT, Ж - ЕАЕ, оброблені GNbAc 200 мкг + SMT).

Фігура 18. Кінетика клінічного показника ЕАЕ Груп А, Б, Д і З (А - необроблені ЕАЕ позитивні контролю, Б - ЕАЕ, оброблений GNbAc1 200 мкг, Д - ЕАЕ, оброблений DMF, З - ЕАЕ, оброблений 200 мкг GNbAc+DMF).

Фігура 19. Кінетика часу на Rotarod при 23 об/хв

Вісь Х: Дні вимірювань значень, у відповідності з протоколом. Вісь Y: Збільшення або зменшення часу на Rotarod, щодо 7 дня. А: Групи А, Б, "1 ін'єкція" і "2 ін'єкції" Env; Б: Групи А, Б, В і Е; В: Групи А, Б, Г і Ж; Г: Групи А, Б, Д і З.

Фігура 20. Кінетика часу на Rotarod 26 об/хв

Вісь Х: Дні вимірювань значень, у відповідності з протоколом. Вісь Y: Збільшення або зменшення часу на Rotarod, щодо 7 дня. А: Групи А, Б, "1 ін'єкція" і "2 ін'єкції" Env; Б: Групи А, Б, В і Е; В: Групи А, Б, Г і Ж; Г: Групи А, Б, Д і З.

Фігура 21. Кінетика часу на Rotarod при 29 об/хв

Вісь Х: Дні вимірювань значень, у відповідності з протоколом. Вісь Y: Збільшення або зменшення часу на Rotarod, щодо 7 дня. А: Групи А, Б, "1 ін'єкція" і "2 ін'єкції" Env; Б: Групи А, Б, В і Е; В: Групи А, Б, Г і Ж; Р: Групи А, Б, Д і З.

Фігура 22. Кінетика клінічного показника ЕАЕ Груп А, Б, В і Г

(А-ЕАЕ хибно-негативні контролю, Б - необроблені ЕАЕ позитивні контролю, Г - ЕАЕ, оброблений GNbAc 200 мкг, Г - ЕАЕ, оброблений GNbAc 500 мкг).

Фігура 23. Кінетика клінічного показника ЕАЕ Груп А, Б, Д і Е

(А - хибно-негативні контролю ЕАЕ, Б - необроблені ЕАЕ позитивні контролю, Г - ЕАЕ, оброблений SMT, Ж - ЕАЕ, оброблений GNbAc 200 мкг+SMT)

Фігура 24. Кінетика клінічного показника ЕАЕ Груп А, Б, Ж і З (А - хибно-негативні контролю ЕАЕ, Б - необроблені ЕАЕ позитивні контролю, Д - ЕАЕ, оброблений DMF, З - ЕАЕ, оброблений GNbAc 200 мкг+DMF).

Фігура 25. Кінетика збільшення маси за період дослідження

(Відносне збільшення маси порівняно з днем до першої ін'єкції імуногенів): Групи А, Б, В і Г (А - хибно-негативні контролю ЕАЕ, Б - необроблені ЕАЕ позитивні контролю, В - ЕАЕ, оброблений GNbAc 200 мкг, Г - ЕАЕ, оброблений GNbAc 500мкг).

Фігура 26. Кінетика збільшення маси за період дослідження

(Відносне збільшення маси порівняно з днем до першої ін'єкції імуногенів): Групи А, Б, Д і Е (А - хибно-негативні контролю ЕАЕ, Б - необроблені ЕАЕ позитивні контролю, Г - ЕАЕ, оброблені SMT, Ж - ЕАЕ, оброблені GNbAc 200мкг + SMT).

Фігура 27. Кінетика збільшення маси за період дослідження

(Відносне збільшення маси порівняно з днем до першої ін'єкції імуногенів): А, Б, Ж і З (А - хибно-негативні контролю ЕАЕ, Б - необроблені ЕАЕ позитивні контролю, Д - ЕАЕ, оброблені DMF, З - ЕАЕ, оброблені GNbAc 200 мкг + DMF).

Фігура 28. Кінетика часу на Rotarod при 16 об/хв

Вісь Х: Дні вимірювань значень, у відповідності з протоколом. Вісь Y: Збільшення або зменшення часу на Rotarod, щодо Дня 7. А: Групи А, Б, В і Г; Б: Групи А, Б, Д і Е; В: Групи А, Б, Ж і З.

Фігура 29. Кінетика часу на Rotarod 26 об/хв

Вісь Х: Дні вимірювань значень, у відповідності з протоколом. Вісь Y: Збільшення або зменшення часу на Rotarod, щодо Дня 7. А: Групи А, Б, В і Г; В: Групи А, Б, Д і Е; С: Групи А, Б, Ж і З.

Фігура 30. Кінетика часу на Rotarod при 29 об/хв

Вісь Х: Дні вимірювань значень, у відповідності з протоколом. Вісь Y: Збільшення або зменшення часу на Rotarod, щодо Дня 7. А: Групи А, Б, В і Г; В: Групи А, Б, Д і Е; С: Групи А, Б, Ж і З.

Фігура 31. Кінетика клінічного показника EAE всіх груп протягом періоду дослідження (А - хобно-негативні контролі EAE, Б-позитивні контролі хибно-оброблені ізотипом антитіла, В - EAE оброблений GNbAc 500 мкг, Г - EAE, оброблений фумаратом натрію і Д - EAE, оброблені GNbAc 500 мкг + фумарат натрію).

5 Список використаних скорочень

Абревіатура	
3-NT	3-нітротирозин
ANOVA	Дисперсійний аналіз
APC	Паличка аденоматозного поліпозу
C57bl/6	Назва лінії чорних мишей
CDR	Комплементарно-визначені регіони
CIPD	Хронічна запальна демієлінізуюча поліневропатія
CNPase	3'-фосфодіестераза циклічних нуклеотидів
DAPI	4', 6-діаміно-2-феніліндол
DMF	Диметилфумарат
D-NAME	D-N ^G нітроаргініну метиловий ефір
EAE	експериментальний аутоімунний енцефаломієліт
eGFP	"Посилений" зелений флуоресцентний білок
Env	Білок оболонки
FBS	Фетальна бичача сироватка
FITC	Флуоресцеїн
GalC	Галактоцереброзид
HERV-W	ендогенний ретровірус типу W людини
huGAPDH	Гліцеральдегід 3-фосфат дегідрогеназа людини
huiNOS	індуцибельна синтаза оксиду азоту людини
HuSH	Абревіатура для певної ДНК-конструкції
IFA	Неповний ад'ювант Фрейнда
iNOS	індуцибельна синтаза оксиду азоту
IRAK1/4	кіназа, асоційована з рецептором інтерлейкін-1 1/4
iv	внутрішньовенно
LAL	Лізат амебоцитів Limulus
LDL	Ліпіди низької щільності
L-NAME	L-N ^G нітроаргініну метиловий ефір
LSD	апостеріорний метод LSD Фішера - назва статистичних тестів
MBP	Основний білок мієліну
MC	Метоцел
MOG	Глікопротеїн мієлінового олігодендроциту
MS	Розсіяний склероз
MSRV	ретровірус, асоційований з розсіяним склерозом
NAWN	Нормальна виникаюча біла речовина
NfκB	Ядерний фактор енансер легкого ланцюга типу κ активованих В-клітин
NO	Молекули окису азоту або радикали окису азоту
HC	Нервова система
O4	Ім'я конкретного епітопу, що присутній на олігодендрогліальних клітинах
ODC	орнітиндекарбоксилаза
OPC	Клітини попередники олігодендроцитів
OPCGS	Розчин для росту OPC
OPCM	Культуральне середовище OPC
PBS	Фосфатно-сольовий буфер
PDGFRα	Фактор росту тромбоцитарних рецепторів альфа-типу
PFA	Парафармальдегід
pGFP	Зелений флуоресцентний білок
PTX	Коклюшний токсин
QC	Контроль якості
riNOS	iNOS щура
RNS	Активні форми азоту
SCID	Важкий комбінований імунодефіцит

SEM	Стандартна похибка середнього
shRNA	Мала шпилькова РНК
SMT	S-метил-ізотіосечовина
SNAP	S-нітрозно-N-ацетил-DL-пеніциламін
TLR4	Toll-подібний рецептор 4
TNF α	Фактор некрозу пухлини альфа-типу
TRIF	TIR-домен-вмісний адаптер індукуючий інтерферон- β
$\Delta\Delta Ct$	Стандартна одиниця для відносної кількісної оцінки РНК

Наступні приклади є ілюстративними і не обмежують винахід.

Приклад 1: Блокада ремієлінізації, індукована білком оболонки HERV-W сімейства (інгібує диференціювання олігодендрогліальних клітин попередників при демієлінізованих ураженнях нервової системи).

1.1 Матеріали і методи

1.1.1. Культура клітин-попередників олігодендроцитів

Клітини-попередники олігодендроцитів щура (OPCS) очищали, як описано раніше²². OPC зберігали в середовищі для проліферації (середовище Sato, яке доповнено 10 нг/мл рекомбінантного основного фактору росту фібробластів людини і 10 нг/мл рекомбінантного тромбоцитарного фактору росту людини -AA; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Німеччина), в той час як диференціацію ініціювали середовищем Sato, яке доповнено 0,5 % фетальної телячої сироватки. Фетальні клітини попередники олігодендроцитів людини (hOPC) і відповідне середовище були отримані від 3H Biomedical, Uppsala, Швеція. Рекомбінантний Env був отриманий і очищений за допомогою PX PX-Therapeutics (Grenoble, Франція) відповідно до вимог QC GeNeuro (Geneva, Швейцарія) поставляли білкові партії. Рівні ендотоксину становили <5 ОЕ/мл, як виміряно за допомогою тесту лізату амебоцитів Limulus (LAL). Env стимуляцію проводили за допомогою трьох різних підходів із застосуванням i) рекомбінантного повнорозмірного Env білка, що розведений в середовищі для диференціації при 10 нг/мл, 100 нг/мл і 1000 нг/мл, ii) рекомбінантного білка Env, що нанесений на культуральні чашки для клітин при поверхневій концентрації 17,53 нг/см² і iii) шляхом посіву OPC на трансфековані U343 клітини гліобластоми з гіперекспресією Env відповідно. Контрольні експерименти по стимуляції проводили за допомогою отримання буфера рекомбінантного Env (20 мМ гістидин, 5 мас/об. % сахароза, 0,01 мас/об. % полісорбат 20, рН 6,0) при рівних розведеннях. Вимірювання NO концентрації в супернатанті OPC проводили із застосуванням колориметричного набору для аналізу окису азоту (Merck-Millipore/Calbiochem, Darmstadt, Німеччина), а поглинання визначали при 540 нм з використанням планшетного рідера Anthos 2001 (Anthos labtec instruments, Salzburg, Австрія). Оцінку морфології OPC проводили за допомогою анти-О4 Merck-Millipore/Chemicon, Darmstadt, Німеччини з урахуванням діаметра клітин і ступеня розгалуження процесу. IRAK-1/4 інгібітор I (1-(2-(4-морфолініл)етил)-2-(3-нітробензоіламід)бензимидазол, N-(2-морфолінілетил)-2-(3-нітробензоіламід) бензимидазол; SigmaAldrich, Hamburg, Німеччина). експерименти проводилися при концентрації 2400 нМ, TRIF інгібуючого пептиду (Invivogen, Сан-Дієго, США) експерименти проводили при концентрації 50 мкМ відповідно до протоколів виробників. Env інактивацію проводили за допомогою впливу на рекомбінантний Env при температурі 123 °C протягом 1 години. Експерименти з блокування рецептора TLR4-антитілом проводили при концентрації антитіла 15 мкг/мл. Експерименти з блокування L-NAME/D-NAME проводили при концентрації 100 мкМ кожного; S-нітрозно-N-ацетил-DL-пеніциламін (SNAP) застосовували в концентрації 100 нг/мл.

1.1.2 Попередники олігодендроцитів і трансфекція U343 клітин гліобластоми

OPC вирощували протягом 24 год. в середовищі для проліферації, а трансфекцію проводили за допомогою реагенту NanoJuice (Merck-Millipore, Дармштадт, Німеччина) із застосуванням кодуєчого shRNA TLR4 супресуючого вектора на основі HuSH 29 pGFP-V-RS вектора (OriGene, Роквілл, штат Меріленд, США) для доказу специфічності анти-TLR4 антитіл. Для експресії зв'язаного з мембраною Env в U343 клітинах гліобластоми вектор⁹, який експресує цитрин для візуалізації трансфекованих клітин комбінували з підвищеною експресією Env (pV14 вектор з 1 по 1629 п.н. HERV-W MSRV типу кодує послідовності env гена-GenBank AF331500.1-поставлених Geneuro SA, Швейцарія) у співвідношенні 1:5. Відповідний порожній вектор застосовували як контроль. Трансфекцію U343 клітин гліобластоми проводили за допомогою Lipofectamine (Life Technologies, Дармштадт, Німеччина).

1.1.3 Фарбування тканин розсіяного склерозу

Для Olig2/Env подвійного фарбування фіксовані формаліном оброблені парафіном MS тканини людини нарізали і 5 мкм зрізи депарафінували ксилолом і регідратували проводкою

через різні концентрації спирту і дистильованої води. Ендогенну пероксидазну активність пригнічували за допомогою інкубування предметного скла в 0,3 %-ний перекису водню в метанолі. Потім скло промивали дистильованою водою і переносили в 10 мМ Тріс, розчин 1 мМ EDTA (pH 9) для досягнення індукованої теплом демаскування антигену. Далі, зрізи охолоджували до кімнатної температури, промивали в фосфатно-сольовому розчині (PBS) і інкубували з анти- Olig2 (1:300; Merck-Millipore) і анти-Env антитілами 3B2H4 (1:500, GeNeuro, Женева, Швейцарія) протягом ночі при 4 °C. Потім зрізи інкубували з Alexa 488-міченими антитілами осла проти кролика (1:400; Life Technologies/Molecular Probes, Дармштадт, Німеччина) з метою виявлення Olig2 і Alexa 555-міченого антитіла осла проти миші для візуалізації Env. Для TLR4/PGRFRα подвійного фарбування готували зрізи із замороженої тканини, і 5 мкм зрізів інкубували з анти-TLR4 (1:100; Merck-Millipore) і анти-PDGFRα антитілом (1:50; eBiosciences, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) протягом ночі при 4 °C. TLR4 детектували за допомогою Alexa 488-міченого антитіла осла проти миші (1:400; Life Technologies/Molecular Probes) і PDGFRα біотинільованим антитілом кролика проти щура (1:500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, США) і Alexa 647-міченим стрептавідином (1:400; Life Technologies/Molecular Probes), відповідно. Для фарбування ядер зрізи інкубували з розчином барвника Hoechst (1:100; Sigma-Aldrich, Гамбург, Німеччина) протягом 1 хвилини і покриваючи Vectashield (Vector Laboratories). Мікроскопічний аналіз проводили на Leica TCS SP 2 AOBS конфокальному лазерному скануючому мікроскопі (Leica Microsystems, Heidelberg, Німеччина).

1.1.4 Фарбування культивованих клітин

Фарбування фіксованих у формальдегіді культивованих клітин проводили, як описано раніше²². Первинні антитіла були розбавлені наступним чином: анти-TLR4 антитіла (1/1000; Merck-Millipore, Дармштадт, Німеччина), антитіло до Env 3B2H4 (1/500; GeNeuro, Женева, Швейцарія), антитіло до 2', 3'-циклічний нуклеотид 3'-фосфодіестерази (CNPase) (1/1000; Covance, Принстон, Нью-Джерсі, США), моноклональні антитіла проти основного мієлінового білка (MBP; 1/1000; Covance, Принстон, Нью-Джерсі, США), поліклональні антитіла проти основного мієлінового білка (1:1000; Millipore, Швальбаха, Німеччина), антитіла проти галактоцереброзиду (Galc), анти-O4 антитіла (обидва 1/1000; Merck-Millipore, Дармштадт, Німеччина); анти-3-NT антитіла (1/1000; Abcam, Кембридж, Массачусетс, США) і анти-NFκB антитіла (1/1000; Abcam, Кембридж, Массачусетс, США). Alexa Fluor 488- і Alexa Fluor 594-кон'юговані антитіла (обидва 1:500,) застосовували для візуалізації сигналу. Ядра фарбували 4, 6-діаміно-2-феніліндолом (DAPI; Roche, Базель, Швейцарія).

1.1.5 Отримання РНК, синтез кДНК і кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

Очищення РНК з культивованих клітин проводили за допомогою методу RNeasy (Qiagen, Hilden, Німеччина). Виділену РНК піддавали зворотній транскрипції за допомогою високо-ефективного набору для зворотної транскрипції кДНК (Life Technologies/Applied Biosystems). Кількісне визначення рівня експресії генів виконували на системі 7900 HT виявлення послідовності (Life Technologies/Applied Biosystems) за допомогою Power SybrGreen universal master mix (Life Technologies/Applied Biosystems). Послідовності праймерів визначали за допомогою програмного забезпечення PrimerExpress 2.0 (Life Technologies/Applied Biosystems) і перевіряли специфічність ампліконів:

TLR4_fwd: CTGGGTTTCTGCTGTGGACA (SEQ ID No: 7)

TLR4_rev: AGGTTAGAAGCCTCGTGCTCC (SEQ ID No: 8)

riNOS_fwd: CTCAGCACAGAGGGCTCAAAG (SEQ ID No: 9)

riNOS_rev: TGCACCCAAACACCAAGGT (SEQ ID No: 10)

huiNOS_fwd: TGAGGAGCAGGTGCGAGGACT (SEQ ID No: 11)

huiNOS_rev: TGATAGCGCTTCTGGCTCTTG (SEQ ID No: 12)

huGAPDH_fwd: TGGACCTGACCTGCCGTCTA (SEQ ID No: 13)

huGAPDH_rev: AGGAGTGGGTGTCGCTGTTG (SEQ ID No: 14)

TNFα_fwd: AGCCCTGGTATGAGCCCATGTA (SEQ ID No: 15)

TNFα_rev: CCGGACTCCGTGATGTCTAAG (SEQ ID No: 16)

IL1β_fwd: GAAACAGCAATGGTCGGGAC (SEQ ID No: 17)

IL1β_rev: AAGACACGGGTTCATGGTG (SEQ ID No: 18)

IL6_fwd: GTTGTGCAATGGCAATTCTGA (SEQ ID No: 19)

IL6_rev: TCTGACAGTGCATCATCGCTG (SEQ ID No: 20)

GAPDH_fwd: GAACGGGAAGCTCACTGGC (SEQ ID No: 21)

GAPDH_rev: GCATGTCAGATCCACAACGG (SEQ ID No: 22)

ODC_fwd: GGTTCCAGAGGCCAAACATC (SEQ ID No: 23)

ODC_rev: GTTGCCACATTGACCGTGAC (SEQ ID No: 24)

GAPDH і ODC були використані як референсні гени, а відносні рівні експресії генів були визначені відповідно до $\Delta\Delta Ct$ (Life Technologies/Applied Biosystems). Кожен зразок вимірювали в чотирьох повторностях; дані представлені у вигляді середніх значень \pm стандартне відхилення, і t-тест застосовували для визначення статистичної значущості.

5 1.2 Результати

1. 2. 1 Локалізація Env білка близька до хронічних активних MS пошкоджень і в околицях резидентних OPC

Застосовуючи імуногістологічний аналіз ми вивчали локалізацію білка Env у зразку тканин людського мозку. Дане показало досить численну наявність Env білка в NAWM близько до хронічних активних MS пошкоджень (CAL, Фіг. 1Б), а також в околицях CAL в безпосередній близькості від Olig2-позитивних OPC (Фіг. 1Г). NAWM на більш далекій відстані до уражень не показує помітним Env імунореактивності (Фіг. 1А.). З метою подальшого доведення, потенційного впливу білка Env на резидентні OPC і, таким чином, на відповідне лагодження мієліну, ми, крім того, шукали TLR4 і тромбоцитарний альфа фактор росту рецепторів (PDGFR α) - двічі позитивних OPCs. Ми могли виявити їх у здоровому мозку (Фіг. 1Г-Г'') і в NAWM MS (Фіг. 1Д-Д''). Наочно було продемонстровано, що в MS мозку, TLR4-позитивні OPCs можуть бути виявлені в безпосередній близькості від HERV-W Env експресуючих клітин або відповідного секретованого білка, що робить їх прийнятними мішенями даних TLR-4 патогенних агоністів, як було описано 10. Тим не менше, дане є несподіваним висновком і відкриває ще небачені перспективи для застосування, тому що раніше було невідомо, що TLR4 експресується при таких умовах в OPC і, більше того, як продемонстрували пізніше, тому що HERV-W білок оболонки, такий як MSRV-Env, не може, отже, розглядатися для безпосередньої взаємодії з OPC на даному конкретному етапі диференціювання з остаточними драматичним впливом на їх потенціал мієлінізації.

25 1.2.2 TLR4 експресія культивованими OPC щура і людини

Попередні дослідження, по суті, свідчили про TLR4-залежну прозапальну дію на моноцити і клітини дендритів¹⁰. Anti-TLR4 імуномічення підтвердило експресію даного рецептора на поверхні олігодендроцитальних клітин попередників щура і людини (Фіг. 2В, В' і 5Б). Крім того, специфічний shRNA-опосередкований нокдаун TLR4 в OPC щурів обґрунтував специфічність попереднього імуномічення (Фіг. 2Б, Б'). Для того щоб оцінити кінетику експресії рецептора TLR4, від молодих до зрілих OPC, ми провели ко-фарбування з використанням антитіл до галактоцереброзиду (GalC), а також антитіл до основного білка мієліну (MBP), маркера для більш зрілих OPC, після трьох і шести днів диференціювання в культурі (Фіг. 2В-Г'). Несподівано було виявлено, що експресія гену рецептора TLR4 через деякий час пригнічувалася в процесі клітинного диференціювання (Фіг.2А), у той час як специфічна детекція білка TLR4 дала тільки слабкий сигнал на пізніх тимчасових точках в морфологічно зрілих OPC щура (Фіг. 2Г), в порівнянні з більш молодими клітинами.

40 1.2.3 Стимуляція OPC Env індукованою експресією прозапальних цитокінів та індукованої NO-синтази

Стимуляція OPC щура рекомбінантним Env білком, що розчинений у середовищі (розчинний Env; 100 нг/мл; Фіг. 3А), що нанесений на культуральні чашки для клітин (твердий Env; Фіг. 3Б) або надекспресуючим на поверхні трансфектованих клітин гліобластоми U343 (PV14Env; Фіг. 3 В-Д') призвела до сильного збільшення транскрипції індукбельної синтази оксиду азоту (iNOS), також як до індукції прозапальних цитокінів, таких як TNF α ; IL-1 β і IL-6 (Фіг. 3 І-Л) порівняно з контрольними (буфер або порожній вектор для обробки) умовами. У свою чергу, підвищена експресія iNOS призводить до залежного від концентрації Env підвищення її нітрозивного стресу, утворюючи продукт оксиду азоту (NO) в клітинних супернатантах (Фіг. 3З). Цікаво, що морфологія OPC щура залишалася незмінною протягом Env стимуляції, як було показано О4 фарбуванням олігодендроцитів, що здійснювалася через один і п'ять днів впливу Env (Фіг. 3 Е-Ж'). GalC-позитивні OPC людини також були знайдені, експресуючими TLR4 (Фіг 5Б, Б') і стимуляція рекомбінантним Env (як у розчині, так і як нанесеним на поверхню тарілки) аналогічно індукувала iNOS транскрипцію (Фіг. 5А). Крім того, ми виявили, що Env стимуляція не впливає ні на виживання OPC (як показано за допомогою TUNEL і кількісної оцінки загального числа клітин; дані не представлені), ні на індуковане старіння фенотипу OPC (досліджуваного шляхом фарбування на β -галактозидазу; дані не показані). Env стимуляція дозрілих OPC щурів (matOPCs; зберігали в середовищі для диференціювання протягом шести днів) призводить до істотно більш слабкої, прозапальної реакції, яку було визначено рівнем транскрипції iNOS, TNF α , IL-1 β та IL-6, у порівнянні з впливом на незрілі OPC (Фіг. 4). Це спостереження у відповідності з даними про більш низький рівень експресії TLR4, що виявлений в зрілих OPC

(Фіг. 2), і підтверджує відмінну чутливість незрілих клітин у відношенні Env, що відповідає TLR-4 рівнем експресії.

1.2.4 Env, що опосередковує свій вплив через TLR4 і прозапальна відповідь включає в себе IRAK 1/4, TRIF і NFκB

Для того, щоб довести специфічність Env до TLR4 і пролити додаткове світло на нижчерозташований сигналінг ми провели ряд контрольних дослідів (Фіг. 6). Термоінактивація рекомбінантного Env перед OPC стимуляцією призводить до дуже значного зниження індукції iNOS в порівнянні з контрольною групою (Фіг. 6А). Аналогічне значне скорочення iNOS транскрипції може спостерігатися при використанні опосередкованої антитілом блокади TLR4 тим самим підтверджуючи специфічність Env до даного рецептора і його актуальність щодо спостережуваних нижчерозташований прозапальних ефектів (Фіг. 6Г). Для того, щоб пролити світло на внутрішньоклітинні шляхи TLR4 активації за допомогою Env, ми досліджували роль двох відомих нижчерозташований шляхів, що слідує за TLR4 активацією, MyD88-залежний шлях за участю IRAK-1/4 (інтерлейкіновий рецептор 1-асоційованої кінази-1/4) і MyD88-незалежний шлях за участю TRIF (TIR-домено-вмісний адаптер, індукуючий інтерферон-β). Застосування IRAK-1/4 інгібітора I або TRIF інгібіторного пептиду призвело до значного зниження рівня експресії iNOS у присутності Env (Фіг. 6Б, В) демонструючи, що Env-опосередкована активація TLR4 призводить до активації обох MyD88-залежного, так само як MyD88- незалежного шляху передачі сигналу. Обидва шляхи можуть сходиться на NFκB (ядерний фактор енансер легкого ланцюга типу κ активованих В-клітин) ядерної транслокації. За допомогою анти-NFκB антитіла, ми підтвердили, що Env стимуляція призводить до сильного збільшення OPC з ядерною локалізацією NFκB (Фіг. 6Д-Ж'), надаючи пояснення активації транскрипції, яка спостерігається прозапальних цитокінів.

1.2.5 Env-опосередкована індукція маркера нітрозивного стресу нітротирозину

NO, рівень якого був підвищений після Env стимуляції (див. Фіг 3 З), є активною формою азоту (RNS). NO може реагувати з безліччю внутрішньоклітинних молекул, включаючи білки, нуклеїнові кислоти і ліпіди, що призводить до формування 3-нітротирозинових залишків (3-NT). Ми виявили, що дія рекомбінантних білків Env на OPC щура призводить до сильного збільшення 3-NT-позитивних клітин в порівнянні з буферними контролюми (Фіг. 7Б, Б' і В, В'), яка вказує на NO-опосередковану індукцію нітрозивного стресу. Однак, після попередньої інкубації з інгібуючими iNOS молекулами L-NAME (метиловий ефір L-N^G-нітроаргініну) продукція NO, як було встановлено, була значно знижена (дані не показані), як і формування 3-NT позитивних OPC (Фіг. 7 Г, Г'). При застосуванні D-NAME, неактивного енантіомера L-NAME, як негативний контроль, ENV-опосередковане 3-NT формування не було порушено (Фіг. 7 Д, Д'). З іншої сторони, застосування SNAP (S-нітрозоз-N-ацетилпеніциламін), сильного NO донора, служило як позитивний контроль, і призвело до нітротирозинілюванню майже всіх OPC (Фіг. 7Е, Е'). Важливо відзначити, що 3-нітротирозин позитивні OPC, що виявлені за рахунок експресії їх маркера попередника PDGFRα, також можуть бути виявлені в NAWM мозку хворих (Фіг. 7 Ж-Ж'), що вказує на патологічно схожий стресорний механізм в MS.

1.2.6 Env впливає на експресію мієліну в OPC

Після вказаних знахідок ми досліджували, чи може Env білок впливати на процеси олігодендроцитального диференціювання, які, як показано, є необхідними для можливості відновлення мієліну. Для даної мети, Env стимульовані OPC щурів оцінювали відносно рівня експресії мієлінових білків CNPase (2', 3'-циклічний нуклеотид 3-фосфодіестерази) після трьох днів Env стимуляції і MBP (основний білок мієліну) після шести днів стимуляції, відповідно. Результати показали, що Env сильно скорочував кількість CNPase і MBP-позитивних клітин (Фіг. 8А-Г'') на відміну від незмінної експресії маркера попередника O4 (Фіг. 3 Е-Ж'). Дане свідчить про значно порушену реакцію клітинного диференціювання при наявності білка Env. Проте, додавання L-NAME, але не D-NAME паралельно з Env стимуляцією може відновити експресію MBP (Фіг. 8 Д-З'), що свідчить про прямий зв'язок між утворенням 3-NT через нітрозивний стрес і зменшену здатність до диференціації OPC.

1.3 Аналіз результатів

Неефективна ремієлінізація НС в нейрозапальних демієлінізуючих захворюваннях, таких як MS, як вважають, в першу чергу викликається зниженням здатності резидентних OPC до правильного диференціювання і ремієлінізації демієлінізуювальних аксонів¹¹⁻¹³, але не було відомо ні однієї основної і вищерозміщеної патогенної молекули, що викликає блокаду такої ремієлінізації. Попередні дослідження вже показали, що білок оболонки Env з HERV-W, також названий "Асоційованим з розсіяним склерозом ретровірусним елементом" (MSRV), при отриманні з відповідних ретровірусних частинок¹⁴, надає прозапальний вплив на одноядерні клітини, активують вроджену імунну систему, які, в свою чергу, виробляють основні прозапальні

цитокіни¹⁰. Однак, прямий зв'язок між Env і зниженням здатності до диференціювання OPC досі не була показана, і не могла бути припущена. Тут ми показали, що даний білок Env може бути виявлений в MS-ураженої тканини НС, і що Env може заважати диференціювання OPC через раніше невідому наявність Env рецептора, TLR4, на OPC на певній стадії диференціювання.

Даний шкідливий ефект обумовлений iNOS. Дана стресорна відповідь призводить до формування нітротирозину і безпосередньо впливає на експресію мієлінового білка. Цікаво, що Env стимуляція не впливає на ступінь виживання OPC клітин, а клітинна морфологія залишалася незмінною на основі чого можна припустити, що Env-опосередковані сигнали націлені на елементи цитоскелету. Слід відзначити і підтвердити новизну несподіваних результатів, попередні дослідження стверджують відсутність TLR4 в олігодендроцитів клітинах в людському мозку¹⁵. Однак, на відміну від даної думки ми могли б чітко показати, що TLR4 експресується не тільки на культивованих первинних OPC (як щурячого, так і людського походження), але також на PDGFR α -позитивних резидентних OPC в MS тканині людини. Такі відмінності можуть відбуватися з того, що Ленхардт і його колеги використовували більш загальний маркер O4 для детекції олігодендроцитів клітин, а ми спиралися натомість на нещодавно прийнятий маркер попередника PDGFR- α . Тим не менше, ми вперше показали даний своєрідний патерн експресії TLR4 в OPC, в той час як в його існування не вірили. Крім того, ми виявили, сильне пригнічення TLR4 при дозріванні OPC, що дозволяє припустити, що експресія рецептора і, отже, схильність до Env, обмежені незрілими клітинами. Тим не менше, дане відкриття є патологічно значущим, оскільки робить дані клітини здатними взаємодіяти безпосередньо з білком Env, який, як показано, експресується і вивільняється при MS ураженнях. У світлі даних висновків ми зробили висновок, що, MSRV/HERV-W Env є не тільки імунпатологічним компонентом MS, але також може чинити істотний негативний вплив на ендогенну здатність відновлення мієліну. Тому було зроблено висновок, що втрата здатності лагодження, як це спостерігається у багатьох пацієнтів з MS під час хвороби, пов'язана з активацією MSRV/HERV-W елементів². Слід зазначити, що попереднє дослідження, яке описує експериментальний вплив білка HERV-W Env кодованого дефектною копією (яка не проявляє RT-активності, не утворює частинки, через відсутність послідовностей кодування в генах gag і pol) зі стабільною вставкою на хромосомі 7¹⁶. Даний білок Env може бути експресований єдиним кодованим геном HERV-W 7q елементу (env, або ERVW-E1 локус), має чотири амінокислотну делецію в С-кінцевій частині свого поверхневого домену, очевидно, викликаючи властиву клітинну маршрутизацію і, як відомо, володіє in vivo експресією на рівні білка, що обмежений плацентою^{17, 18}. Даний білок дійсно є прикладом "одомашненого" HERV білка¹⁷, який тепер грає фізіологічну роль у формуванні синцитіотрофобластичної тканини і тому названий "Синцитін"¹⁹. Відповідний домен злиття в HERV-W Env, а також як і TLR4-зв'язуючий домен, можуть бути більш-менш консервативними між HERV-W підтипами (наприклад, MSRV-Env або Сінтіцин). Їх доступність як поверхневий білок або позаклітинний білок з конформаційною експозицією активного домену строго регулюється, і фізіологічна роль синцитіну залишається в межах синцитіотрофобласту і обмежується присутністю в плаценті. Таким чином, пов'язана патогенність, очевидно, є відмітною ознакою не фізіологічної активації, наприклад, за рахунок певних інфекційних агентів навколишнього середовища^{20, 21} у людей, або в експериментальних трансгенних умовах in vivo або in vitro. Як повідомляється, синцитін знаходиться в астроглії НС у пацієнтів з розсіяним склерозом (MS), але використання антитіл в іншому сполученні дозволило виявити HERV-W MSRV-Env підтип, а не синцитін²². Послідовність синцитіну може, тим не менше, бути експресованою шляхом трансгенезу в астроцитах миші, викликаючи вивільнення цитокінів, шкідливих для олігодендроцитів¹⁶, але трансгенні миші показали нежиттєздатність (особисте спілкування С. Power до Н. Perron, Neurovirology symposium, Сан-Дієго, 2007). Тим не менше, в той час як Antony і колеги виявили, що паличка аденоматозного поліпозу (APC)-позитивні мієлінізуючі олігодендроцити є уразливими до синцитін-опосередкованої цитотоксичності в таких мізках трансгенних мишей, ми змогли продемонструвати, що тільки незрілі OPCs значно схильні Env-опосередкованим прозапальним сигналам, тоді як у зрілих клітин такого немає. Таким чином, результати даного дослідження, по всій видимості, є результатами артефактних експериментальних умов, які пов'язані з їх умовами експресії, яку викликано трансгенезом плацентарного білка в клітинах головного мозку. На відміну від даних результатів, які виведені з штучних умов, авторами показаний ушкоджуючий механізм, який спрямований на здатність ендогенного ремонту нервової системи (НС) дорослого, а не патологію MS, таку, яка помітно показує імуніопосередковану втрату олігодендроцитів і мієлінової оболонки при пошкодженні аксонів. Дійсно, ENV-опосередковані ефекти на клітині імунної системи в асоціації із запальними ураженнями NS є тепер добре документованими^{7,10,23-25}, але ніякі попередні дослідження не свідчать про таку пряму патогенність HERV-W Env на

гіалічних клітинах з участю в блокаді ремієлінізації MS бляшок за рахунок OPCs. Дані результати, що зв'язують імуногістологію мозку при MS, показують сильну експресію білка Env в активних MS бляшках або на краю менш активних уражень, тепер підтримують таку роль у відомому дефекті ремієлінізації за рахунок OPC при MS ураженнях.

5 Приклад 2: Блокада ремієлінізації, яка індукована білком оболонки HERV-W сімейства ефективно лікуватися антитілом специфічним до Env

Білок оболонки HERV-W сімейства оболонки (Env, зокрема, із асоційованого з розсіяним склерозом ретровірусного підтипу, MSRV-Env) є потужним інгібітором здатності не мієлінізуючих OPC диференціюватися в мієлін виробляють зрілі олігодендроцити, які є важливим етапом у процесі ремієлінізації. Ми досліджували вплив MSRV-Env білка на експресію двох різних маркерів диференціювання олігодендроцитів:

10 - CNPase (2', 3'-циклічний нуклеотид-3'-фосфогідролазу) є 4 % загального білка мієліну і присутній у цитоплазмі не компактизованої олігодендрогіалічної оболонки аксонів. CNPase є найбільш раннім відомим мієлін-специфічним білком, який синтезується шляхом розвитку олігодендроцитів.

15 - MBP (основний білок мієліну) є цілих 30 % білків мієліну і відіграє важливу роль при ущільненні мієліну в центральній і периферичній нервовій системі. Він з'являється послідовно після CNPase як *in vitro*, так і *in vivo*, і є специфічним маркером зрілих олігодендроцитів. Метою даного дослідження було визначення того, чи можуть специфічні антитіла до Env, такі як GNBAC1, рекомбінантне гуманізоване IgG4 моноклональне антитіло до Env, блокувати інгібування дозрівання OPC, що індуковане MSRV-Env. Справді, такий ефект GNBAC1 буде свідчити про те, що антитіла здійснюють "анти-блокаду ремієлінізуючих клітин". Для того, щоб перевірити дану гіпотезу, первинну культуру OPCs людини інкубували з MSRV-Env, з або без GNBAC1, або шляхом нанесення рекомбінантного білка на поверхню культури або шляхом додавання білка в культуральне середовище. Експресію CNPase (як ранній маркер дозрівання) і MBP (як пізній маркер дозрівання) оцінювали шляхом імуноцитохімії після одного або трьох днів стимуляції, відповідно.

20 У даному прикладі, MSRV-ENV відноситься до повнорозмірного рекомбінантного MSRV-Env білка, який містить внутрішньоклітинні, трансмембранні і позаклітинні домени білка оболонки HERV-W.

Представлені тут результати показують, що OPC людини специфічно експресують TLR4 на своїй плазматичній мембрані, і демонструють, що рекомбінантний білок MSRV-Env специфічно і суттєво зменшує кількість CNPase і MBP-позитивних клітин. Дані спостереження знаходяться у відповідності з наведеними Прикладом 1 на OPC людини і щура. Крім того, наші експерименти показують, для початкового часу, що гальмування (блокада) дозрівання OPC людини, яке індуковано за рахунок MSRV-Env, який повністю усувається шляхом обробки GNBAC1, демонструючи дані нові і раніше несподівані лікувальні якості. Дане в свою чергу забезпечує додаткову ознаку в лікуванні прогресуючих форм розсіяного склерозу.

2.1 Матеріали і методи 2. 1.1.Матеріали

40 Матеріали, які використовуються для первинної культури OPC людини

	Постачальник	Посилання	Серійний номер
Клітинний інкубатор	ThermoScientific	HePA Class 100	--
Стерильна витяжка	Fisher Bioblock Scientific	Steril VBH Compact	--
OPC людини	3H Biomedical (ScienCell)	1600	10805
Повні OPC	3H Biomedical (ScienCell)	1601	10887
Середовище		1652 (OPCGS)	10576
		0503 (P/S)	9846
PBS	Gibco	10010	954270
T75 флакон	Corning	2148R	03412012
Labtek 8-лункові	Nunc	154534	081711-8-0 081611-8-0
Poly L-Lysine (Полі L-лізін)	Sigma-Aldrich	P4707	RNBC2451
10 мл піпетки	Greiner-Bio one	607180	11032401
5 мл піпетки	Greiner-Bio one	606180	11051101

Матеріали, які використовуються для оцінки експресії маркерів дозрівання в OPC людини

	Постачальник	Посилання	Серійний номер
PBS	Gibco	10010	954270
Параформальдегід	Sigma-Aldrich	15,812-7	STBB5309
TritonX 100	Fluka	BP151-100	104484
Фетальна бичача сироватка	Sigma-Aldrich	F6178-500ML	090M8404
Anti-CNPase антитіла	Eurogentec (Covance)	SMI91-R	E11BF00277
Anti-MBP антитіла	Eurogentec (Covance)	SM99	E12DF00468
Anti-TLR4 антитіла	AbNOVA	H00007099-M03	11293-1H7
FITC антитіла осла проти миші	Millipore	AP124F	LV1688510
Покривне скло	Gerhard Menzel	B7257M	0290880
Середовище для заливки Vectashield+DAPI	Vector Laboratories	H1500	X1118
Axioscope мікроскоп	Zeiss	--	--
AxioCam	Zeiss	--	--
AxioVision	Zeiss	--	--

5 Матеріали, які використовуються для стимуляції OPC MSRV-Env, GNbAC1 і MSRV-Env буфером

	Постачальник	Посилання	Серійний номер
Рекомбінантний MSRV-Env	PXTherapeutics	ENV-T	110719-1 (22A)
MSRV-Env-T буфер	PXTherapeutics	--	--
GNbAC1	Polymun	GNbAC1	T96/bAC1/B1

2.1.2 Протоколи

Інкубація OPC людини з MSRV-Env, MSRV-Env буфером і GNbAC1

10 Повно-розмірний рекомбінантний MSRV-Env був отриманий і очищений за допомогою PX Therapeutics (548 ак., 61, 44 кДа) (серія 110719-1). Початкова концентрація становила 0,6 мг/мл (9,76 мкМ). MSRV-ENV буфер (20 mM Trizma-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 % SDS, 10 mM DTT) був наданий PXTherapeutics. Даний розчин використовували як негативний контроль. GNbAC1 (Batch T96/bAC1/B1, виробництво GMP) був отриманий і очищений за допомогою Polymun Scientific, Відень, Австрія. Початкова концентрація становила 10 мг/мл (68,03 мкМ).

15 OPC людини стимулювали різними способами, або шляхом нанесення розчинів на поверхню тарілки для культивування клітин до висіву клітин, або шляхом додавання їх в клітинне культуральне середовище після посіву клітин. У будь-якому випадку 8-лункову слайд-камеру labtek (Nunc) попередньо покривали полі-L-лізином (Sigma-Aldrich) протягом ночі при 37 °C.

20 Покриття скла 8-лункової камери Labtek

Різні речовини розводили в PBS в стерильному ламінарному боксі (Fischer Bioblock, Франція), 8 лункові слайд-камери Labtek (Nunc; 250 мкл на лунку) покривали наступним чином:

- MSRV-Env (1 мкг/мл) з покриттям протягом 2 год. при 37 °C.
- 25 - MSRV-Env буфер (таке ж розведення, ніж MSRV-Env) з покриттям протягом 2 год. при 37 °C.
- MSRV-Env+GNbAC1 A1: MSRV-Env (1 мкг/мл) і GNbAC1 (7,35 мкг/мл = 50 нМ) суміш з покриттям протягом 2 год. при 37 °C.
- MSRV-Env+GNbAC1 A2: MSRV-Env (1 мкг/мл) і GNbAC1 (29,4 мкг/мл = 200 нМ) суміш з покриттям протягом 2 год. при 37 °C.
- 30 - MSRV-Env+GNbAC1 B1: MSRV-Env (1 мкг/мл) з покриттям протягом 2 год. при 37 °C, промиті PBS і потім покриті GNbAC1 (7,35 мкг/мл = 50 нМ) протягом 1 год. при 37 °C.
- MSRV-Env+GNbAC1 B2: MSRV-Env (1 мкг/мл) з покриттям протягом 2 год. при 37 °C, промиті PBS і потім покриті GNbAC1 (29,4 мкг/мл = 200 нМ) протягом 1 години при 37 °C.
- 35 - GNbAC1 A1 тільки: GNbAC1 (7,35 мкг/мл = 50 нМ) з покриттям протягом 2 год. при 37 °C
- GNbAC1 A2 тільки: GNbAC1 (29,4 мкг/мл = 200 нМ), з покриттям протягом 2 год. при 37 °C.

- GNBAC1 B1 тільки: PBS протягом 2 год. при 37 °C, потім покриті GNBAC1 (7,35 мкг/мл = 50 нМ) протягом 1 год. при 37 °C.

- GNBAC1 B2 тільки: PBS протягом 2 год. при 37 °C, потім покриті GNBAC1 (29,4 мкг/мл = 200 нМ) протягом 1 год. при 37 °C.

5 - BSA (1 мкг/мл) з покриттям протягом 2 год. при 37 °C.

- BSA+GNBAC1 A1: суміш BSA (1 мкг/мл) і GNBAC1 (7,35 мкг/мл = 50 нМ) з покриттям протягом 2 годин при 37 °C.

- BSA+GNBAC1 A2: BSA (1 мкг/мл) і GNBAC1 (29,4 мкг/мл = 200 нМ) суміш з покриттям протягом 2 год. при 37 °C.

10 - BSA+GNBAC1 B1: BSA (1 мкг/мл) з покриттям протягом 2 год. при 37 °C, промиті PBS, а потім покриті GNBAC1 (7,35 мкг/мл = 50 нМ) протягом 1 год. при 37 °C.

- BSA+GNBAC1 B2: BSA (1 мкг/мл) з покриттям протягом 2 год. при 37 °C, промиті PBS, а потім покриті GNBAC1 (29,4 мкг/мл = 200 нМ) протягом 1 год. при 37 °C.

Клітини-попередники культури олігодендроцитів людини

15 OPC, виділені з головного мозку людини, були придбані у ScienCell Research Laboratories (через 3 H Biomedical, Швеція). Кожен флакон містить $> 1 \times 10^6$ клітин в 1 мл. Повне OPC культуральне середовище (OPCM) було відновлено шляхом додавання розчину для зростання OPC (OPCGS) і пеніциліну/стрептоміцину (P/S) в OPCM, відповідно до рекомендації виробника (Sciencell).

20 Флакон, що містить OPC людини, поміщали на водяну баню при 37 °C і обережно перемішували шляхом обертання до повного розморожування вмісту. Клітини обережно ресуспендували за допомогою піпетки Gilson 1 мл. Потім вони розбавляли повною OPCM і засівали у 8-лунковий посудини для культивування labtek (7000 клітин/см²=10000 клітин на лунку) попередньо покриті полі-L-лізином (0,01 %, Sigma) і з (або без) обробок, описаних вище
25 (див 3.2.1.1) в стерильному ламінарному боксі (Fisher Bioblock, Франція). Культури інкубували при 37 °C; 5 % CO₂ до подальших імуноцитохімічних експериментів. Живильне середовище міняли на наступний день для видалення залишкового DMSO і неприкріплених клітин в культурах, які обробляються протягом 72 год.

Інкубація в культуральному середовищі з MSRV-Env

30 Після 3 годин попереднього культивування (див 3.2.1.2) OPC людини в 8-лункових камерах для культивування labtek, клітини інкубували при 37 °C протягом 24 год. або 72 год. у 8-лункових камерах labteks (250 мкл/лунка) з додаванням наступних розчинів:

- MSRV-Env буфер, який застосовується як негативний контроль, додавали в повне середовище для культивування клітин.

35 - MSRV-Env, що доданий при 3 нМ (0184 мкг/мл) в повне середовище для культивування клітин.

- MSRV-Env (3 нМ) + GNBAC1 (200 нМ; 29,4 мкг/мл) суміш, яка додана в повне середовище для культивування клітин.

- GNBAC1 (200 нМ), що доданий поодиночі в повне середовище для культивування клітин.

40 Експресія TLR4 і маркери мієлінізації в OPC in vitro

Після 24 або 72 год. інкубації, середовище для культивування клітин видаляли і OPC людини, що стимульовані шляхом обробок, які описані вище (див 3.2.1) фіксували в розчині параформальдегіду (4 % PFA в PBS, 250 мкл на камеру) при кімнатній температурі протягом 1 години. Потім їх промивали три рази PBS (3 × 250 мкл на камеру), неспецифічні сайти зв'язування насичували шляхом інкубації з 10 % фетальною бичачою сироваткою (FBS) в розчині PBS, що містить 0,1 % Тритон X100 (250 мкл на камеру) протягом 1 год. при 37 °C. У разі TLR4 фарбування, клітини інкубували з 10 % FBS в PBS тільки (250 мкл на камеру). Після насичення, культури OPC інкубували з розчином первинного антитіла протягом ночі при 4 °C, що розведений в 10 % FBS в розчині PBS (200 мкл на камеру), наступним чином:

50 - Мишачі антитіла до TLR4 1/1000 (після 24 і 72 год. культивування)

- Мишачі антитіла до CNPase 1/200 (після 24 год. стимуляції)

- Мишачі антитіла до MBP 1/100 (після 72 год. стимуляції)

Клітини промивали 3 рази в PBS (3 × 250 мкл на камеру), і інкубували з розчином вторинного антитіла протягом 1 год. при 37 °C (250 мкл на камеру), наступним чином:

55 - FITC-кон'юговані антитіла осла проти миші 1/200.

Після 3 промивок в PBS (3 × 300 мкл на камеру) при кімнатній температурі, пластикові камери відокремлювали від предметного скла. Потім предметне скло поміщали в середовище для заливки Vectastain®, що містить DAPI (Vectashield). Фарбування візуалізували методом флуоресцентної мікроскопії з використанням Axioscope мікроскопа (Zeiss).

60

Аналіз даних

Після 24 годин стимуляції MSRV-Env-T (або контролем), CNPase імунореактивність клітини підраховували в 10 кадрах випадково вибраних в камері. Відсоток CNPase-позитивних клітин розраховували як:

$$5 \quad \frac{100 \times n \text{ CNPase} +}{n \text{ DAPI}} n \text{ CNPase} + = \text{кількість імунореактивних OPC для CNPase}$$

Після 72 годин стимуляції MSRV-Env-T (або контролем), MBP імунореактивність клітини підраховували в 10 випадково вибраних кадрах в камері. Відсоток MBP-позитивних клітин був розрахований як:

$$\frac{100 \times n \text{ MBP} +}{n \text{ DAPI}} n \text{ MBP} + = \text{кількість імунореактивних OPC для MBP}$$

10 Дані представлені як середнє значення +/- стандартна похибка відсотка CNPase або MBP позитивних клітин. Графіки отримували за допомогою GraphPad Software, 5.00 версії для Windows (Сан-Дієго Каліфорнія, США). Непараметричні статистичні тести проводили за допомогою Sigma Stat (Чикаго, Іллінойс, США).

15 Наступні результати були отримані протягом трьох незалежних серій експериментів, кожен з яких виконаний з новою ампулою заморожених комерційних OPC: OPC ICC 01, OPC ICC 02 і OPC ICC 03.

2.2 Результати

2.2.1 Експресія TLR4 рецепторів у OPC людини in vitro

20 Експресію TLR4 оцінювали за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії. Етап насичення, що зроблений без будь-яких детергентів, дозволяв виявити TLR4 тільки на поверхні клітин. Даний експеримент підтвердив присутність рецептора мішені MSRV-Env на клітинній поверхні OPC людини через 24 і 72 год. первинної культури (не показано).

2.2.2 Експресія CNPase і MBP в OPC людини in vitro

25 Морфологію OPC людини in vitro візуалізували за допомогою мікроскопії в світлому полі. OPC представляло тіло клітини і в цілому два клітинних розширення. CNPase і MBP експресії були підтверджені за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії після 24 год. і 72 год. в культурі, відповідно (не показані).

30 2.2.3 Вплив MSRV-Env з або без GNBAC1 на диференціювання OPC людини Вплив нанесеного MSRV-Env на експресію маркерів дозрівання OPC людини в первинній культурі (OPC ICC 01)

Метою даної першої серії експериментів (OPC ICC 01) було встановлення умов для первинної культури OPC людини, а також протоколів імунофарбування слайд-камер labteks, які попередньо покриті MSRV-Env і CNPase і MBP.

35 Labtek посудини для культивування покривали 1 мкг/мл MSRV-Env перед посівом OPC людини. Як негативний контроль (буфера), культуральні посудини інкубували при тих же умовах, тільки з буфером MSRV-Env.

Відсоток CNPase позитивних клітин був значно знижений з 85 ± 4 % в контрольних умовах (буфер) до 69 ± 6 % в OPC людини, які стимульовані протягом 24 год. в labteks попередньо покритих MSRV-Env (* $p < 0,05$; t-тест) (Фіг. 9А).

40 Після 72 год. культивування, відсоток MBP-позитивних клітин значно знизився з 74 ± 7 % при контрольних умовах (буфер) до 25 ± 3 % в labteks попередньо покритих MSRV-Env (+Env-T) (* $p < 0,0001$ ранговий критерій Манна-Уїтні) (Фіг. 9Б). Дані результати показують, що MSRV-Env інгібує дозрівання OPC людини в мієлінізуючих клітинах in vitro.

Вплив GNBAC1 на інгібування дозрівання OPC, що індукований MSRV-Env (OPC ICC 02)

45 Метою даної другої серії експериментів (OPC ICC 02) було підтвердження ефекту MSRV-ENV на диференціювання OPC людини і визначення того, чи можуть MSRV-Env інгібувати диференціювання OPC людини при додаванні білка безпосередньо в середовище для культивування клітин. Крім того, ми також протестували, чи може GNBAC1 інгібувати вплив MSRV-Env в даній моделі.

50 У разі стимуляції OPC людини в labteks попередньо покритих MSRV-Env, GNBAC1 обробки оцінювали при двох різних протоколах. По-перше, labtek культуральне предметне скло попередньо інкубували з сумішшю MSRV-Env (1 мкг/мл) і GNBAC1 (50 нМ або 200 нМ) до посіву OPC (умова GNBAC1-A).

55 Другий протокол включав в себе послідовне покриття з MSRV-Env (1 мкг/мл) з подальшим покриттям GNBAC1 (50 нМ або 200 нМ) перед посівом OPC (умова GNBAC1-B).

Вплив MSRV-ENV і GNBAC1 на експресію CNPase OPC людини

Після 24 год. стимуляції, значне зниження відсотка CNPase позитивних клітин з 75 ± 2 % в контрольних умовах (буфер) до 55 ± 2 % спостерігали в labteks, попередньо покритих 1 мкг/мл MSRV-Env (* $p < 0,001$ у порівнянні з буфером; однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим аналізом за допомогою апостеріорного критерію Фішера). Крім того, стимуляція в labteks, які

5 попередньо покриті 1 мкг/мл BSA, не робить впливу на CNPase експресію (71 ± 2 %), демонструючи, що ефект, який спостерігається з MSRV-Env є специфічним, оскільки він не був помічений з контрольним білком (Фіг. 10A).

GNbAC1 значно інгібує зниження CNPase позитивних клітин, що індуковані в labteks, попередньо покритих MSRV-Env (Фіг. 10A). Ефект GNbAC1 видно при 50 нМ і 200 нМ, а в двох тестованих протоколах обробки: (I) умова GNbAC1-A, 50 нМ (69 ± 4 %), 200 нМ (80 ± 2 %); (II) умова GNbAC1-B 50 нМ (96 ± 3 %) і 200 нМ (76 ± 4 %) ($\psi p < 0,001$, однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим аналізом за допомогою апостеріорного критерію Фішера). Крім того, ефект GNbAC1, очевидно, залежить від концентрації (Фіг. 10 A).

Додаткові контрольні експерименти показали, що OPC людини, що стимульовані протягом

15 24 год. в labteks, попередньо покритих одним GNbAC1 (50 нМ або 200 нМ), або сумішшю GNbAC1 (50 нМ або 200 нМ) + BSA (1 мкг/мл), не робить ніякого впливу на експресію CNPase в порівнянні з контрольною умовою (буфер) ($p > 0,05$; One-way ANOVA) (Фіг. 10B). Дані спостереження були зроблені по двох протоколах обробки GNbAC1, які описані раніше (GNbAC1-A 50 нМ, GNbAC1 200 нМ і GNbAC1-B 50 нМ).

Даний експеримент також показує, що навіть низькі концентрації MSRV-Env в розчині викликають значне зниження відсотка CNPase позитивних клітин після 24 год., з 78 ± 2 % в контрольних умовах (буфер) до 57 ± 2 % у групі MSRV-Env (* $p < 0,001$ у порівнянні з буфером; однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим аналізом за допомогою апостеріорного критерію Фішера) (Фіг. 11). Крім того, обробка GNbAC1 (200 нМ) повністю протидіє зниженню експресії CNPase, що викликана MSRV-ENV (76 ± 2 %; $\psi p < 0,001$ у порівнянні з ENV-T; однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим аналізом за допомогою апостеріорного критерію Фішера). Цікаво відзначити, що 200 нМ GNbAC1 поодино (74 \pm 2 %) не робить ніякого впливу на експресію CNPase в порівнянні з контрольною умовою (буфер) (Фіг. 11).

Вплив MSRV-Env і GNbAC1 на експресію MBP в OPC людини

Після 72 годин стимуляції, значне зниження відсотка MBP позитивних клітин з 76 ± 2 % в контролях (буфер) до 57 ± 1 % спостерігається в labteks, які попередньо покриті 1 мкг/мл MSRV-Env (** $p < 0,001$ у порівнянні з буфером; однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим аналізом за допомогою апостеріорного критерію Фішера) (Фіг. 12A). У даному експерименті було

35 показано, що відсоток MBP-позитивних клітин в OPC-культури в labteks, попередньо покритих BSA (1 мкг/мл), дещо відрізнявся від контролю (буфер) (69 ± 2 %). Однак, BSA також показував істотно інший вплив у порівнянні з MSRV-Env ($p < 0,001$ у порівнянні з Env-T; однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим аналізом за допомогою апостеріорного критерію Фішера), і, таким чином, показував, що повинні бути ізолювані і не впливати тільки в даній серії експериментів, оскільки не спостерігаються в інших експериментах або з CNPase в даній же серії.

GNbAC1 значно інгібує зменшення MBP-позитивних клітин, які індуковані в labteks, попередньо покритих MSRV-Env (Фіг. 12A). Частковий ефект GNbAC1 з'являється при 50 нМ, а повне інгібування досягається при 200 нМ, і в обох тестованих протоколах обробки: (i) GNbAC1-A 50 нМ (69 ± 2 %) і 200 нМ (73 ± 2 %) і (ii) GNbAC1-B 50 нМ (68 ± 2 %) і 200 нМ (74 ± 2 %) ($\psi p < 0,001$ у порівнянні з Env-T; однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим аналізом за допомогою апостеріорного критерію Фішера). Крім того, ефект GNbAC1 очевидно, залежить від концентрації (Фіг. 12A).

Даний експеримент також демонструє значне зменшення відсотка MBP-позитивних клітин від 76 ± 2 % в контрольних умовах (буфер) до 55 ± 2 % в клітинах, які стимульовані додаванням MSRV-Env в культуральне середовище (3 нМ) протягом 72 год. (* $p < 0,001$ у порівнянні з буфером; однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим аналізом за допомогою апостеріорного критерію Фішера) (Фіг. 12B). Крім того, обробка GNbAC1 (GNbAC1 200 нМ) повністю інгібує зменшення MBP експресії індукованої MSRV-Env (76 ± 2 %; $\psi p < 0,001$ у порівнянні з Env-T; однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим аналізом за допомогою апостеріорного критерію Фішера) (Фіг. 12B).

Підтвердження GNbAC1 ефектів на інгібування диференціювання OPC індукованого MSRV-Env (OPC ICC 03)

Хоча описані вище результати були отримані із значної кількості зібраних даних, метою даної третьої серії експериментів (OPC ICC 03) була повне відтворення ефекту GNbAC1 при

60 абсолютно самостійній серії експериментів.

Вплив MSRV-ENV і GNBAC1 на CNPase і MBP експресію в культурі OPC людини

Після 24 год. стимуляції, значне зниження відсотка CNPase позитивних клітин з 90 ± 1 % в контрольних умовах (буфер) до 71 ± 1 % спостерігається в labteks, попередньо покритих MSRV-Env (1 мкг/мл) (* $p < 0,05$; ранговий дисперсійний аналіз Крускала-Уолліса з подальшим апостеріорним аналізом Стюдента-Ньюмана-Кейлса) (Фіг. 13А). Як описано вище, GNBAC1 (200 нМ) повністю звертає інгібування експресії CNPase, що викликане MSRV-Env при двох GNBAC1 тестованих протоколах обробок (GNBAC1-90 \pm 2 %, GNBAC1-B: 91 \pm 4 %) ($\psi p < 0,05$ у порівнянні з Env-T; ранговий дисперсійний аналіз Крускала-Уолліса з подальшим апостеріорним аналізом Данна) (Фіг. 13А).

Після 72 год. стимуляції, значне зниження відсотка MBP позитивних клітин з 78 ± 2 % при контрольних умовах (буфер) до 55 ± 3 % спостерігається в labteks, попередньо покритих MSRV-ENV (1 мкг/мл) протягом 72 год. (* $p < 0,05$ у порівнянні з буфером; ранговий дисперсійний аналіз Крускала-Уолліса з подальшим апостеріорним аналізом Данна) (Фіг. 13Б). Як описано вище, GNBAC1 (200 нМ) повністю змінює інгібування MBP експресії, що викликане MSRV-ENV у двох GNBAC1 тестованих протоколах обробок (GNBAC1-A: 80 \pm 2 %, GNBAC1-B: 75 \pm 2 %) ($WP < 0,05$ у порівнянні з Env-T; ранговий дисперсійний аналіз Крускала-Уолліса з подальшим апостеріорним аналізом Данна) (Фіг. 13Б).

Об'єднання даних експериментів OPC ICC 02 і OPC ICC 03

Результати, що отримані в двох різних серіях експериментів (OPCICC02 і OPCICC03), представлені вище, були об'єднані в одному аналізі. Таким чином, дані нанесені на Фіг. 14 є від 8 до 14 незалежних експериментів для CNPase (Фіг. 14А) і MBP (Фіг. 14Б). Даний аналіз показує, що MSRV-Env і GNBAC1 вплив на диференціювання OPC людини є високо відтворюваними і послідовними.

Для того, щоб нормалізувати експресію даних, контрольна умова (буфер) була використана як референс, і вважається 100 %. Таким чином, дані результати показують, що концентрації MSRV-Env, які використовуються в даній серії, інгібують 24 % кількості CNPase позитивних клітин (CTRL: 100 \pm 1 %; ENV: 76 \pm 1 %) і 27 % кількості MBP- позитивних клітин (Ctrl: 100 \pm 2 %; ENV: 73 \pm 2 %). GNBAC1 (200 нМ) повністю змінює ефект MSRV-ENV на експресію CNPase (GNBAC1-A: 102 \pm 1 %; GNBAC1-B 101 \pm 1 %) (Фіг. 15А), але також і ефект на експресію MBP (GNBAC1-A: 101 \pm 2 %; GNBAC1-B 97: \pm 2 %) (Фіг. 15Б).

2.3 Аналіз результатів

Отже, дані з цього прикладу показують, що MSRV Env індукує міцне і високо відтворюване зниження експресії двох різних специфічних маркерів дозрівання олігодендроцитів. Таким чином, MSRV Env інгібує диференціювання попередників олігодендроцитів людини в мієлінізуючі клітини. Крім того, ми наочно продемонстрували тут, що GNBAC1 повністю усуває даний шкідливий вплив MSRV Env і відновлює нормальний рівень CNPase і MBP в даній моделі. Вказані результати показують, що GNBAC1 лікує блокаду диференціювання OPC, індукованої HERV-W/MSRV-Env. Таким чином, дані результати підкріплюють інноваційне показання GNBAC1 для лікування демієлінізованих уражень, які викликані HERV-W-Env. Вони, зокрема відносяться до прогресивних форм розсіяного склерозу, для яких ремієлінізація є критичною, але не походить від оточуючих OPC MS уражень, у зв'язку зі зберігаючими Env-позитивними клітинами і секрецією, як показано в Прикладі 1.

Приклад 3: Дослідження терапевтичних ефектів GNBAC1 антитіла, L-NAME, SMT, DMF або фумарату натрію при Експериментальному Алергічному Енцефаломієліті (EAE) на мишачій моделі індукованого глікопротеїном олігодендроцитів мієліну (MOG, Myelin oligodendrocyte glycoprotein) і MSRV/HERV-W білком оболонки (Env).

3.A Порівняння між окремими молекулами (монотерапія) і асоціації антитіла анти-Env з малими молекулами, що інгібують Env-індуковані ефектори при OPC блокаді (комбінована терапія).

3.A.1. Матеріали

C57BL/6 миші з Charles River.

MOG 35-55 EspiKem, Srl (Polypeptide company); посилання: SC1272.

GNBac1; партія T950111-8 (Анти MSRV/HERV-W гуманізовані IgG4 антитіла, що включають кожну з ділянок, що визначають комплементарність (CDR), які наведені у SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No.3 SEQ ID No: 4, SEQ ID No 5 і SEQ ID No 6.

L-NAME (NG-нітро-L-аргінін метиловий ефір) Sigma; посилання: N5751-5G партія BCBF4375V

SMT (S) Метилізотіо сечовина (Sigma); посилання: M84445-100G партія STBC1003V

Диметилфумарат (DMF) Sigma; посилання: 242926-100G партія 2507VBCBH

Метоцел MC Sigma; посилання: 64605-100G партія BCBD9989V

IFA (Sigma) Sigma; посилання: F5506-10ML партія: 061M8728

PTX (Коклюшний токсин; Calbiochem); посилання: 516561 партія D00128881

PBS (фосфатно-сольовий буфер; Lonza); посилання 516561; партія: D00128881

Env (P'X Therapeutics); виробничі партії очищеного білка, перевірені на відсутність ендотоксину (тест $LDL < 5 \text{ UL/мл}$) і біоактивні (Geneuro внутрішні тести QC). Прилад Rotarod (LE8200; Bioseb Франція)

3.A.2. Методи

Вільні від патогенів миші жіночої статі C57BL/6 (6-8 тижнів) були придбані у Charles River Laboratories і підтримувалися на апаратурі для тварин протягом одного тижня до імунізації. За один день до імунізації, всі миші були зважені, а потім оцінювалися на тесті обертового барабана.

Обертовий барабан

Дні тестування: 9 і 8 днів до імунізації. Мишей транспортували в їхніх домашніх клітках, з кімнати, в якій тварини утримувалися, в експериментальну кімнату. Миші звикали до експериментальної кімнати протягом 15 хв. В період навчання, кожну мишу поміщали на барабан, що обертається з постійною швидкістю (4 оберти за хвилину), якщо одна миша падала, то її повертали на обертовий барабан, до тих пір, поки миші не ставало комфортно на обертовому барабані, миші бігали протягом 120 с. Всіх мишей повертали в їх клітки, швидкість збільшували до 13 об/хв, і мишей знову поміщали на обертовий барабан на 120 с. Всіх мишей повертали в їх клітки, швидкість збільшували до 19 об/хв, і мишей знову поміщали на обертовий барабан на 120 с. Середовище приміщення для дослідів залишалося постійним між тестовими сесіями щодо температури, і інтенсивності світла.

Тестові дні:

1 день до кожної імунізації мишей транспортували в їх клітках з кімнати, в яких їх тримали, в експериментальну кімнату. Мишей привчали до експериментальної кімнати протягом 15 хв. Потім мишей піддавали двом випробуванням при 10 збільшуючих рівнях швидкості, починаючи з 7 до 40 об/хв. Окремі затримки перед падінням з обертового барабана (для двох випробувань на кожному рівні швидкості) реєстрували до 60 с. Таким чином, для кожної тварини визначали підготовку і продуктивність в системі обертового барабана.

Результати випробувань на обертовому барабані виражаються у вигляді кінетики середньої індивідуальної оцінки для кожної групи зі стандартною похибкою, зазначені в барах, для кожного дня випробування і для кожної тестованої швидкості в необхідному діапазоні для нейромоторного погіршення в даних умовах (від 16 до 29 об/хв).

Вони розраховуються для кожної окремої миші, для кожного дня тестування і для кожного значення швидкості, як відносне збільшення або зменшення часу на обертовому барабані (до падіння), у порівнянні з першим тестовим днем при одній і тій же швидкості (Д-7, перед початком індукції хвороби у відповідних групах). Значення розраховується як "Час на обертовому барабані на день X" - "Час на 7 день для тієї ж миші з тією ж швидкістю". Цифри показують кінетику для різних груп на весь період навчання, для характерних дискримінаційних значень швидкості, при достовірній диференціації хворих від здорових тварин в наших умовах (наприклад, занадто високі або занадто низькі значення швидкості, або здорові падають негайно або хворі здатні підтримувати повільний рух).

Дані про початкову вагу і продуктивність своїм власним контролем, перш ніж середне значення і стандартне відхилення були розраховані в групі. Різні групи тварин були розміщені однорідно в кожній клітині, відповідно до відповідної інформації, яку надано, перед кожною експериментальною серією.

Клінічна оцінка

Тварин зважували і клінічно оцінювали 5 днів на тиждень у відповідності з наступними критеріями: 0 = без ознак; 1 = параліч хвоста або гіпер-рефлексія задньої кінцівки(ок) або одностороння слабкість задніх кінцівок; 2 = двостороння слабкість задніх або передніх кінцівок; 3 = плюс односторонній параліч або великий дефіцит; 4 = повний параліч задніх кінцівок або передніх; 5 = плюс частковий параліч або великий дефіцит протилежних кінцівок; 6 = агонія або смерть. Вони були взяті зі стандартних критеріїв з тим, щоб відобразити більш швидко індукцію пошкоджень головного мозку і шийного мозку даною моделлю.

Мишей зважували 3 рази на тиждень по понеділках, середах і п'ятницях протягом всіх експериментів.

Для серії експериментів Прикладу 3.A, групи визначали наступним чином.

Всім групам 6 (шість) мишей вперше робили щеплення підшкірно в області шиї на день 0, потім збоку спини на 7 і 14 день; 200 мкг MOG/мишу + 60 мкг MSRV-ENV+IFA.

Група А була позитивною контрольною групою MSRV-Env, що індукує EAE без будь-якого лікування.

Для груп Ж-З, обробку GNBac1, L-NAME, SMT і DMF окремо або разом з GNBac1 при дозах, які зазначені нижче, проводили на 12 день після імунізації, коли вже спостерігалось прогресування клінічних симптомів EAE. GNBac1 гуманізоване антитіло вводили один раз, а L-NAME або SMT вводили кожні 4 дні до припинення дослідження на 29 день. Що стосується груп Д і З, які відносяться до лікування DMF, ми визначили обсяг щоденних витрат води для кожної миші, і встановили, що (в наших умовах), кожна миша споживає близько 3,5 мл питної води в день. Таким чином, на основі даних вимірювань, доза в 1 мг DMF+0,08 % Methocel була додана в 3,5 мл питної води на мишу щодня.

350 нг коклюшного токсину (PTX) на тварину, вводили (i.p.) у всіх групах на той же день після кожної ін'єкції імуногену, і відтворювали через 2 дні, як звичайно в протоколах EAE, щоб полегшити міграцію лімфоцитів через кров - гематоенцефалічний бар'єр.

Узагальнена презентація експериментальних груп в Прикладі 3.А

Група	MOG (мкг)	Env	Розчинник	PTX	GNBac1	L-NAME	SMT	DMF	n=48
А:	200								6
Необроблений EAE		+	IFA	+	-	-	-	-	
Б: GNBac1	200	+	IFA	+	+	-	-	-	6
В: L-NAME	200	+	IFA	+	-	600 мкг/ 500 мкл IP	-	-	6
Г: SMT	200	+	IFA	+	-	-	1мг в 500 мкл IP	-	6
Д: DMF	200	+	IFA	+	-	-	-	1мг + 0,08 % Methocel в 3,5 мл питної води. Щодня	6
Е: GNBac1+ L-NAME	200	+	IFA	+	+	600 мкг/ 500м кл IP	-	-	6
Ж: GNBac1 SMT	200	+	IFA	+	+	-	1мг в 500 мкл IP	-	6
З: GNBac1+ DMF	200	+	IFA	+	+	-	-	1мг + 0,08 % Methocel в 3.5 мл питної води. Щодня	6

3.А.3 Результати

Клінічні спостереження

Оцінку клінічних ознак і маси регулярно проводили, як описано вище. Рахунок кінетики EAE за досліджуваний період представлений на Фіг. 16, 17 і 18.

Регулярний і постійний розвиток EAE клінічних показників, таких як гіпер-рефлексія, параліч хвоста, слабкість задніх кінцівок, передніх кінцівок і частковий параліч, міг бути зафіксований у всіх мишей до кінця дослідів в групі А (EAE позитивний контроль) і до 12 дня в інших групах, які були оброблені на 12-й день GNBac1 гуманізованими антитілами (група Б) або анти-вільних радикалів (група В, Г, Д) окремо або групами, які були оброблені одночасно GNBac1 і анти-вільними радикалами (групи Е, Ж, З).

Спостереження після обробки: клінічні ознаки у групі Б, яку оброблено тільки 1 раз з GNBAC1, злегка зменшувалися до дня 29. У групах, які оброблені тільки L-NAME, SMT, нерегулярне відновлення можна було спостерігати, але зі зменшенням прогресування ЕАЕ. Слід зазначити, що на +16 день, введення SMT було перервано.

Що стосується груп Д, Ж і З, які оброблені одночасно GNBAC1 і L-NAME, SMT і DMF відповідно, відновлення було набагато більш значним і, зокрема, в групах Ж і З. Дані результати показують, що синергічні ефекти значно прискорюють і збільшують симптоми ЕАЕ. Варто також відзначити, що лікування даними речовинами не викликає яких-небудь відхилень в будь-якій групі мишей (у тому числі контрольних мишей, які досліджувались окремо).

По результатам, які представлені на Фіг. 16, 17 і 18, можна резюмувати, що:

- найбільш підвищений клінічний показник (при найгіршому розвитку захворювання) засвідчений у необроблених тварин (група А). Тваринам, які оброблені тільки GNBAC1 (група Б), стає краще після його введення (починаючи з 12-го дня).

- групи, що оброблені L-NAME або SMT тільки, мали більш низькі показники відновлення і кінетику, ніж група Б.

- група Д, що оброблена DMF, і група Е, оброблена GNBAC1 (200 мкг разова доза) в поєднанні з L-NAME мали еквівалентне відновлення до кінця дослідження.

- група Ж, що оброблена антитілами GNBAC1 в поєднанні з SMT, і група Н, що оброблена GNBAC1 антитілами в поєднанні з DMF, мала значно краще відновлення в кінці дослідження і більш ранню кінетику клінічного поліпшення, ніж всі інші групи. Дане демонструє синергічне посилення об'єднання GNBAC1 і SMT або GNBAC1 і DMF, для значного поліпшення терапевтичного результату.

Випробування на обертовому барабані

Насамперед, має бути чітко зазначено, що групи з надписом "1 ін'єк." і "2 ін'єк." на Фіг. 19 відповідають контрольним тваринам, яким вводили тільки один раз (1) або два рази (2) Env білок і MOG антиген, у порівнянні з трьома ін'єкціями Env білка і MOG антигену, які необхідні, щоб викликати клінічний прояв ЕАЕ, як у всіх інших групах. Вони є контрольними мишами, що піддаються Env нижче патогенного порогу і без індукції клінічної картини захворювання. Вони підтверджують, що для того, щоб всі тварини були протестовані при різних обробках, що індукують у розвитку гострої і серйозної ЕАЕ симптоматики і поступової зміни, потрібна подібна картина трьох ін'єкцій. Таким чином, терапевтичні ефекти, які спостерігаються у оброблених тварин, актуальні для ефективності лікування в поточних і прогресуючих захворюваннях.

Відповідно до результатів, які представлені на Фіг. 19, з показниками випробування на обертовому барабані при 23 об/хв, ми можемо побачити, що:

- Фізичні зусилля при 23 об/хв досягають достатнього порогу для того, щоб розкрити основні сенсорні і моторні дисфункції у тварин: не оброблена група А має найгірший результат і кінетику, в той час як тварини з одноразовою або дворазовою ін'єкцією ("1 ін'єк. або 2 ін'єк."), мають значно більш слабкі симптоми і більш помітні зміни. Зневажливий і прогресивний клінічний дефіцит в контрольній групі Б підтверджує, що хвороби і відповідні ушкодження NS були дуже активними при 3 ін'єкції Env. Тому всі інші групи з різними обробками піддавалися подібній сильній індукції захворювання Env.

- Група Б з ЕАЕ, оброблена однією ін'єкцією 200 мкг GNBAC1, має відновлені показники, що подібні до контрольних мишей без індукції хвороби з низьким впливом на Env, наприкінці періоду дослідження.

- Найбільш примітний ефект, в даних умовах, виявлений для групи Ж, обробленої GNBAC1 антитілом в поєднанні з SMT, яка, здається, має яскраву криву кінетики відновлення, яка закінчується при кращих показниках всіх груп в кінці дослідження. Це демонструє синергічне посилення об'єднання GNBAC1 і SMT для значного поліпшення терапевтичного результату.

- Група Г, оброблена SMT, також має тільки поліпшені кінетику і результати (остання точка періоду дослідження), хоча і в меншій мірі.

За результатами, які представлені на Фіг. 20, отримані за допомогою обертового барабана з 26 об/хв, ми бачимо, що:

- Фізичне зусилля при 26 об/хв підтверджує, що дані умови є вищими за поріг, що необхідний в даному експерименті для виявлення важливої чутливої і моторної дисфункції у тварин: контрольна група А має гірші результати і кінетику, в той час як тварини, яким вводили тільки один раз або двічі ("1 ін'єкція або 2 ін'єкції"), мають значно більш слабкі симптоми і більш помітні зміни (дуже хороші параметри на кінець досліджуваного періоду для групи "1 ін'єкція").

- Група Б з ЕАЕ, що оброблена однією ін'єкцією 200 мкг GNBAC1, має відновлені параметри, схожі на Г, Ж, В, Д і З груп і "2 ін'єкції" контроль, наприкінці періоду дослідження.

- Найбільш примітний ефект, в даних умовах, свідчив про те, що група Е, що оброблена GNBAC1 антитілами в поєднанні з L-NAME, очевидно має хорошу криву кінетики відновлення, що закінчується кращим результатом всіх груп в кінці дослідження. Група В, оброблена тільки L-NAME також має поліпшену кінетику і результат, хоча і в меншій мірі. Дане демонструє синергічне посилення об'єднання GNBAC1 і L-NAME для значно поліпшеного терапевтичного результату.

По результатам, які представлені на Фіг. 21 при випробуванні на обертовому барабані з 29 об/хв ми бачимо, що:

- Фізичні зусилля при 29 об/хв досі підтверджують, що дані умови вищі за поріг, що необхідний для ініціації головних сенсорних і моторних порушень у тварин: контрольна група А має найгірший результат і кінетику, в той час як тварини, що ін'єктовані тільки один або два рази ("1 ін'єк. або 2 ін'єк."), мають значно більш слабкі симптоми і більш помітні зміни з аналогічними результатами в кінці дослідження.

- Група Б з EAE, обробленою за рахунок однієї ін'єкції 200 мкг GNBAC1, має відновлені показники, які схожі на контрольних мишей без індукції хвороби з низьким впливом на Env, наприкінці періоду дослідження.

- Найбільш примітний ефект, в даних умовах, свідчить, що група Е, що оброблена GNBAC1 антитілами в поєднанні з L-NAME, що досі, здається, має хорошу криву кінетики відновлення, яка закінчується кращим результатом всіх груп (кінець дослідження). Група В оброблена L-NAME мала поліпшену кінетику і результати, хоча і в меншій мірі.

- Ще одним загальним примітним результатом є систематичне поліпшення мишей з групи Б, які оброблені тільки GNBAC1, який завжди показує в значній мірі стабілізовані і/або поліпшені показники в порівнянні з необробленими тваринами (група А) у всіх умовах (від 16 до 29 об/хв тестів).

Тим не менше, дана очевидна ефективність виявляється значно посиленою, шляхом поєднання GNBAC1 з L-NAME або SMT. Вона була також поліпшена шляхом поєднання з DMF, але з більш повільною кінетикою. В будь-якому випадку, це не виключає поліпшення з оптимізованими дозами і на більш тривалий термін лікування.

Таким чином, у всіх умовах тестування (у тому числі клінічні показники) поєднання SMT, L-NAME або DMF з GNBAC1 забезпечило значну перевагу для клініко-функціонального відновлення в порівнянні з використанням будь-якої терапевтичної молекули, яку випробувано поодиночі. Самі по собі малі молекули, очевидно, мають більш низькі і досить перехідні ефекти, в той час як GNBAC1 має довгострокові наслідки, що забезпечують краще відновлення в кінці дослідження у порівнянні з даними невеликими лікарськими засобами, таким чином, показуючи тривалу ефективність.

Кінетика і амплітуда остаточного відновлення, будучи значно покращеною за рахунок комбінацій, тепер показано перевагу використання комбінації даних терапевтичних засобів для їх синергічних і цільових ефектів на функціональне відновлення в умовах *in vitro*. Дане демонструє зазначення на ранню і більш потужну клінічну ефективність при захворюванні людини.

3.Б. Порівняння терапевтичної ефективності двох доз анти-Env антитіла, які дано окремо як монотерапія або в комбінації з анти-NO лікарськими засобами. 3.Б.1 Матеріали і методи:

Якщо не вказано конкретно, всі матеріали і методи, є такими, як описано в Прикладі 3А.

Експериментальні групи

Узагальнена презентація експериментальних груп Прикладу 3.Б

Група	MOG 200 мкл	ENV 60 мкл	Розчинник	PTX 350 нг	GnbAc1	SMT	DMF
А Ctrl-	+	/	IFA	+	/	/	/
Б Ctrl+	+	+	IFA	+	Placebo	/	/
В GNBAC1	+	+	IFA	+	200 мкг	/	/
Г GNBAC1	+	+	IFA	+	500 мкг	/	/
Д SMT	+	+	IFA	+	200 мкг	+	/
Е SMT	+	+	IFA	+	500 мкг	+	/
Ж DMF	+	+	IFA	+	200 мкг	/	+
З DMF	+	+	IFA	+	500 мкг	/	+

Всі миші отримували три ін'єкції підшкірно на шиї в D0, на дорсальній стороні з D7 і D14. Тут, мишам з групи А вводили тільки MOG 200мкг/мишу і IFA без Env, що є групою негативного контролю без EAE в даній серії (ctrl-). Група позитивного контролю з нелікованим EAE в даній серії представлена групою Б (ctrl+). Іншій групі вводили 200 мкг MOG/мишу + MSRV-ENV (60

мкг) + IFA, з процедурами, як зазначено в вищевикладеній презентації. Лікування було розпочато на 12-й день після імунізації у своїх відповідних групах.

Групи В, Д, Ж отримали 200 мкг GnbAc1 при J12; Групи Г, Е, З отримали 500 мкг GnbAc1 при J12; Група Б отримала тільки GNBAC1 розчин буфера.

5 Групи Д і Е отримали IP ін'єкцію SMT (200 мг/мишу) два рази на тиждень при J12, J14, J19, J21, J26 і J28.

10 Для груп Ж і З, які отримують DMF, ми попередньо визначили обсяг щоденного споживання води кожною мишею, і визначили, що (в наших умовах), кожна миша споживає близько 3,5 мл питної води в день. Таким чином, на основі даних вимірювань, дозу в 2 мг DMF+0,08 % метоцел на мишу додавали до 3,5 мл питної води щодня.

15 Для кожної тестової швидкості обертового барабана, результати були підтверджені при кривих відповідних необроблених мишей з ENV-індукованої ЕАЕ (група Б, що є контролем з необробленою ЕАЕ) показали значний дефіцит в порівнянні з хибними контролями (група А, які імунізовані MOG розведеним у IFA без Env білка). Результати вважалися "неінтерпретуючими" всякий раз, коли такі критерії не були підібрані, як відповідні технічні і експериментальні умови, отже, як такі, що не проходять контроль якості на основі даної значної розбіжності кривих "Позитивних у порівнянні з негативними ЕАЕ" групами.

20 Після 20-ого дня, була зроблена внутрішньовенна (IV) ін'єкція 20 мкг MSRV-Env у фізіологічному розчині, для створення системної гострої проблеми за допомогою MSRV-Env білка у всіх мишей, коли значне клінічне поліпшення (ремісія-подібне) було отримано при більшості обробок у мишей ЕАЕ. Це було зроблено на день D21 для мишей груп Б, Г, Е і З, або на день D22, для мишей груп А, В, Д і Ж, це було виконано з метою вивчення реакції різних груп з гострою Env антигенемією, і оцінки можливих відмінностей у захисній ефективності різних методів лікування.

25 3.Б.2 Результати Клінічні спостереження

Показники клінічних показників і вага регулярно оцінювалися, як описано вище. Кінетика клінічних показників ЕАЕ протягом періоду дослідження представлені в Фіг. 22, 23 і 24. Криві маси, що вказують на відносну масу в порівнянні з днем до першої ін'єкції імуногенів, представлені на Фіг. 25, 26 і 27.

30 Випробування на обертовому барабані

Результати досліджень на обертовому барабані представлені при різних швидкостях (16; 26; 29 об/хв) на Фіг. 28, 29 і 30.

35 Дана серія експериментів стосується впливу середовища (200 мкг) в порівнянні з високою концентрацією (500 мкг) терапевтичного GNBAC1 антитіла як монотерапія, також були проведені аналогічні порівняння при поєднанні з SMT і DMF.

Глобальне порівняння кривих клінічного показника за період дослідження було обґрунтовано, оскільки (I) необроблена Env-індукований ЕАЕ (група Б) має найбільш несприятливі зміни і (II) хибні імунізовані контролі без ЕАЕ (група А) не мають клінічних ознак, що виявляються понад період, який передуює внутрішньовенній ін'єкції (IV) Env на 20-й день.

40 До внутрішньовенної ін'єкції на 20-й день, всі оброблені групи значно відрізнялися від необробленого Env-індукованого ЕАЕ. На 20-й день оброблені групи з різною кінетикою захворювання за період дослідження мали порівняльні показники з середнім значенням нижче 0,5, що вказує на період ремісії у всіх оброблених групах. Дане підтверджує ефективність усіх доз антитіл і всіх протестованих комбінацій як з DMF так і SMT.

45 В подальшому задача з внутрішньовенною (IV) ін'єкцією Env білка на 20 день, мімікрувала пік експресії Env і його вивільнення в кров, як очікувалося, під час ініціації нового і важкого рецидиву, захворювання, яке природно виникає. На Фіг. 22, 23 і 24, пояснені значні відмінності в терапевтичній активності різних продуктів і доз:

50 1) GNBAC1 показав високу ефективність в доданні стійкості даного піку Env антигенемії при дозуванні 500 мкг (група Г), але тимчасові клінічні порушення були виявлені при дозі 200 мкг (група В).

55 2) У разі комбінації з SMT, не було помічено суттєвих варіацій клінічних параметрів при двох дозах GNBAC1 (групи Д і Е). Таким чином, SMT присвоєна підвищена стійкість до IV MSRV-Env, для мишей, які отримали низьку дозу GNBAC1 (200 мкг) в порівнянні з мишами, яких лікували тільки антитілом при даній більш низькій дозі (група В).

60 3) Миші, що оброблені DMF, показали клінічну резистентність до даного піку антигенемії, коли також оброблені більш високим дозуванням GNBAC1 (група З), але не змогли запобігти клінічним порушенням при низькому дозуванні (група Ж). DMF, таким чином, не забезпечує підвищену стійкість до IV MSRV-Env у мишей, які оброблені найменшим дозуванням GNBAC1 (200 мкг). Миші, що оброблені DMF і більш високими дозами GNBAC1 (500 мкг, в групі З)

демонстрували порівняльну стійкість, порівняно з мишами, які оброблені тільки GNbAC1 в тій же дозі (група Г).

4) Криві, що показують збільшення маси протягом періоду дослідження у всіх групах несподівано показали, що група Г, що оброблена GNbAC1 при 500 мкг, мала кращу кінцеву точку.

5) GNbAC1 при 200 мкг (група В) або DMF з GNbAC1 але при більш високій дозі (Група З), дали кінцеві точки, що еквівалентні хибним контролям.

Дане вказує на те, що, крім відносної ефективності різних способів лікування, що показані з показником клінічної кінетики:

- GNbAC1 антитіла самі по собі у високих дозах (500 мкг) демонструють кращу клінічну ефективність. Вони також чинили позитивний вплив на загальне здоров'я тварин, як показано за допомогою динаміки зростання маси.

- У поєднанні з GNbAC1 при більш низькій дозі (200 мкг), SMT показав значно більшу ефективність для лікування, з повною стійкістю до залишкової проблеми MSRV-Env IV.

Дане вказує на те, що GNbAC1 демонструє найсильніше лікування, оскільки забезпечує кращі результати при більш високій дозі (500 мкг), але, і при своїй низькій дозі (200 мкг), воно значно посилено в поєднанні з SMT, яке ефективно запобігає клінічним загостренням після піку Env антигенемії створеної IV ін'єкцією в кінці дослідження.

Крім того, дані результати також показують, що більш високі дози GNbAC1, самі по собі або в комбінації із даними дозами DMF, забезпечують істотне посилення в терапевтичній ефективності у відношенні загального стану здоров'я (відповідно до кривих зростання маси).

Тим не менше, можлива синергія SMT або DMF з GNbAC1 при більш високих дозах, якщо є, неможлива, оскільки антитіло саме по собі вже забезпечує максимальну терапевтичну ефективність при даних умовах індукції захворювання і активності в ЕАЕ у мишей.

Паралельно випробування на обертовому барабані об'єктивно підтверджує, при всіх відповідних швидкостях (Фіг. 28А, 29А і 30А), що більш високе дозування GNbAC1 (500 мкг/мишу) є найбільш ефективним продуктом (що призначається окремо) у поліпшенні неврологічного дефіциту оброблених Env, які індуковані ЕАЕ, мишей.

Випробування на обертовому барабані також підтверджує синергетичні ефекти SMT з GNbAC1, в той же час, що показує неврологічне поліпшення тварин, що оброблені низькими дозами GNbAC1 в поєднанні з SMT, що демонструють значне нейромоторне поліпшення при 26 і 29 об/хв (Фіг 29Б і 30Б). При 16 об/хв (Фіг. 28Б), низька швидкість, здавалося, не забезпечує досить дискримінаційної здатності для підтвердження даного клінічного поліпшення за досліджуваний період.

Нарешті, результати на обертовому барабані показують поліпшення Env-індукованих ЕАЕ у мишей з DMF при обох дозах GNbAC1, але дане стає ясно значущим тільки при 29 об/хв (Фіг. 30 В).

Отже, беручи до уваги результати даної мети і автоматизовані тести, що оцінюють неврологічну продуктивність тварин, GNbAC1 є очевидно, надійним лікуванням, коли дається як монотерапія, що показано в Прикладі 3.Б. Синергетичні ефекти з молекулами анти-NO, як видно з GNbAC1 при більш низькій дозі з SMT, також чітко свідчать і вказують на потужне терапевтичне посилення. Дане має бути при різних дозуваннях GNbAC1, але не може бути виявлено в нинішніх умовах з уже максимальними ефектами 500 мкг з GNbAC1.

3.В. Порівняння між анти-Env антитілом або фумаратом натрію поодиноці (монотерапія) і анти-Env антитіла з фумаратом натрію (комбінована терапія).

3. В 1 Матеріали і методи
Матеріал

Назва	Постачальник	Посилання	Серійний номер
C57bl/6	6 Charles River	/	BEV13587
MOG	polypeptide	SC1272	TD02019C
MSRV-Env	PXTherapeutics	24A	2-20120803
IFA	Sigma	F5506-10ML	M8728
PBS	Lonza	BE17-516F	1MB118
PTX	Calbiochem	516561	D00128881
GNbAc1	(Geneuro)		T950111-8
Диметилфумарат	Sigma	Sigma 42926-100G	2507VBCBH
Rotarod	BIOSEB	LE8200	/
CIMAhер isotype ctrl			911028

Експериментальні групи

Група	MOG (мкг)	ENV	Розчинник	PTX	GnbAc1	Ізотип контрольних антитіл	Фумарат натрію	N=28	Обробка
A)-ctrl	200	-	IFA	+	Placebo	-	-	5	
Б) EAE	200	+	IFA	+	500 мкг placebo/ IP	-	-	7	
Ізотип ctrl									
В) EAE	200	+	IFA	+	Placebo	-	10 мкг	4	День+12
Na2 Фум							В 3,5 мл питної води щодня		Na2 Фум аж до кінця дослідження
Г) EAE	200	+	IFA	+	Placebo	-	10 мкг		День+12
							В 3,5 мл питної води щодня		Na2 Фум аж до кінця дослідження

3. В.2 Результати

5 Клінічні спостереження

Оцінку клінічних ознак і маси регулярно проводили, як описано вище. Показник кінетики EAE за досліджуваний період представлений на Фіг. 31.

Група А, яка представляє негативні контролю, що ін'єктовані IFA, MOG без Env білка і ін'єкції плацебо антитіл, що містять його буфер розчинник, не демонструвала значні клінічні симптоми протягом періоду дослідження.

Поступова зміна EAE клінічних показників може бути зафіксована до 12-ого дня в групах, які були оброблені на 12-й день з GNBAC1 гуманізованими антитілами (група В) або з фумаратом натрію, DMF-зв'язаними анти вільних радикалів окису азоту (анти-NO), поодиноці в групі Г або одночасно з GNBAC1 в групі Е.

Цікаво тут тільки групи, що отримали високі дози GNBAC1 антитіла (В і Д) показали значне повернення своїх показників клінічних кривих і значно поліпшену кінцеву точку в кінці дослідження. Група Г, що оброблена тільки фумаратом натрію не показала будь-якого значного клінічного поліпшення в порівнянні з групою Б, яку оброблено неефективним ізотипом контрольного антитіла (Перекриваючі величини похибок на кривих). Регулярний і постійний розвиток EAE клінічних показників можуть бути записані у всіх мишах аж до кінця досліду в групі Б (Env-індукованої EAE), яку оброблено ізотипом контрольного антитіла без специфічності до білка Env. Дане вказує на те, що терапевтичні ефекти, які спостерігаються з GNBAC1, є специфічними для цього, зокрема, антитіла і не мають відношення до ін'єкції будь-якого гуманізованого антитіла з тим же ізотипом який, наприклад, не буде націлений на той же епітоп.

Таким чином, даний останній приклад показує, що:

- Контрольна група А без введення Env білка поводить як здорові контролю без клінічних ознак, незважаючи на ін'єкції всіх інших компонентів, які необхідні, щоб зводити нанівець Env-індукцію EAE (IFA і MOG), а також зводити нанівець ін'єкції антитіла (Розчинник антитіла); хибної доставки водорозчинного фумарату натрію, що є неявно наданою за рахунок нормальної питної води.

- Найбільш підвищений клінічний показник (при найгіршому розвитку захворювання) зареєстрований у тварин, які оброблені нерелевантним ізотипом контрольного антитіла (Група Б). Дана ін'єкція хибного ізотипу антитіл у присутності Env білка, таким чином, демонструє позитивний контроль EAE з типовою поступовою зміною EAE.

- Група Г, що оброблена тільки фумаратом натрію, мала несприятливий результат в кінці дослідження, який подібний з групою Б, яка оброблена неефективними контрольними антитілами.

- Групи В і Д, що оброблені високими дозами GNBAC1 антитіл окремо або в поєднанні з фумаратом натрію, мали еквівалентне і значно краще відновлення в кінці дослідження. Клінічне поліпшення з'явилося на 15-й день, після початку лікування.

Тут, оскільки фумарат натрію самостійно не чинив ніякого ефекту і, оскільки криві динаміки груп В і Д еквівалентні, терапевтичний ефект, що спостерігається в даних двох групах повинен бути повністю і виключно викликаний GNBAC1, в той час як фумарат натрію показав неефективність.

45 3.Г Аналіз загальних результатів Прикладу 3

На закінчення, окремо або в комбінації, лікування за допомогою анти-Env специфічних антитіл, таких як GNBac1 і антитіл у порівнянні з вільними радикалами окису азоту (анти-NO) сполук, таких як DMF, SMT або L-NAME, є переважними, завдяки лікуванню і запобіганню блокади потенційної активності ремієлінізації, яку викликано HERV-W білком оболонки, зокрема, MSRV-Env, *in vitro* і *in vivo*.

GNBac1 при високому дозуванні (500 мкг/мишу близько 20-25 г) також показав ефективність у порівнянні з низькою дозою (200 мкг), яку дано як монотерапія в даних прикладах.

Посилання:

1. Perron H, Garson JA, Bedin F, et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci US A*. 1997; 94: 7583-8.

2. Perron H, Germi R, Bernard C, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler*. 2012; 18: 1721-36.

3. Bruno S, Cercignani M and Ron MA. White matter abnormalities in bipolar disorder: a voxel-based diffusion tensor imaging study. *Bipolar Disord*. 2008; 10: 460-8.

4. Goghari VM, Rehm K, Carter CS and MacDonald AW. Sulcal thickness as a vulnerability indicator for schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 2007; 191: 229-33.

5. Stevens JR. Neuropathology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1982; 39:1 131-9.

6. Perron H, Hamdani N, Faucard R, et al. Molecular characteristics of Human Endogenous Retrovirus type-W in schizophrenia and bipolar disorder. *Transl Psychiatry*. 2012; 2: e201.

7. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, et al. Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response *in vitro*, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology*. 2001; 287: 321-32.

8. Delarasse C, Smith P, Baker D and Amor S. Novel pathogenic epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein induce experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Immunology*. 2013.

9. Heinen A, Kremer D, Gottle P, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57kip2 is a negative regulator of Schwann cell differentiation and *in vitro* myelination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 8748-53.

10. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H and Marche PN. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol*. 2006; 176:7636-44.

11. Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R and Trapp BD. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2002; 346:165-73.

12. Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J and Bruck W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain*. 2008; 131: 1749-58.

13. Kremer D, Aktas O, Hartung HP and Kury P. The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors. *Ann Neurol*. 2011; 69: 602-18.

14. Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, et al. Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology*. 1999; 260: 1-9.

15. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 8514-9.

16. Antony JM, van Marle G, Opii W, et al. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci*. 2004; 7: 1088-95.

17. Bork P, Brown NP, Hegyi H and Schultz J. The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Sci*. 1996; 5: 1421-5.

18. Blond JL, Beseme F, Duret L, et al. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol*. 1999; 73: 1 175-85.

19. Mi S, Lee X, Li X, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. 2000; 403: 785-9.

20. Ruprecht K, Obojes K, Wengel V, et al. Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. *J Neurovirol*. 2006; 12: 65-71.

21. Ruprecht K and Perron H. Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2005; 293: 2089; author reply-90.

22. Roebke C, Wahl S, Laufer G, et al. An N-terminally truncated envelope protein encoded by a human endogenous retrovirus W locus on chromosome Xq22.3. *Retrovirology*. 2010; 7: 69.
23. Perron H, Germe R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C and Farinelli L. Human Endogenous Retrovirus type W Envelope expression in blood and brain cells provides new insights into Multiple Sclerosis disease. *Multiple Sclerosis journal*. 2012; DOI: 10.1177/1352458512441381.
24. Perron H and Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010; 39: 51-61.
25. Firouzi R, Rolland A, Michel M, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J Neurovirol*. 2003; 9: 79-93.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> женеро

<120> СПОЛУКИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ БЛОКАДИ РЕМІЄЛІНІЗАЦІЇ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ, ЯКІ ПОВ'ЯЗАНІ З ЕКСПРЕСІЄЮ БІЛКА ОБОЛОНКИ HERV-W

<130> BR080066/NJO/CCU

<150> US 61/708779

<151> 2012-10-02

<150> US 61/746792

<151> 2012-12-28

<160> 30

<170> Версія, що патентується 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> ПРТ

<213> Миша хатня

<400> 1

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Миша хатня

<400> 2

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Миша хатня

<400> 3

Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Миша хатня

<400> 4

Asp Tyr Gln Met His
1 5

<210> 5

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Миша хатня

<400> 5

Ala Val Ala Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Миша хатня

<400> 6

Thr Val Val Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 7

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер для ампліфікації

<400> 7

ctgggtttct gctgtggaca

20

<210> 8

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер для ампліфікації

<400> 8

agggttagaag cctcgtgctc c

21

<210> 9

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер для ампліфікації

<400> 9

ctcagcacag agggctcaaa g

21

<210> 10

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер для ампліфікації

<400> 10

tgcacccaaa caccaaggt

19

<210>	11	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер для ампліфікації	
<400>	11	
	tgaggagcag gtcgaggact	20
<210>	12	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер для ампліфікації	
<400>	12	
	tgatagcgct tctggctctt g	21
<210>	13	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер для ампліфікації	
<400>	13	
	tggacctgac ctgccgtcta	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер для ампліфікації	
<400>	14	
	aggagtgggt gtcgctgttg	20
<210>	15	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер для ампліфікації	
<400>	15	
	agccctggta tgagcccatg ta	22
<210>	16	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер для ампліфікації	

<400> 16 ccggactccg tgatgtctaa g	21
<210> 17 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Праймер для ампліфікації	
<400> 17 gaaacagcaa tggtcgggac	20
<210> 18 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Праймер для ампліфікації	
<400> 18 aagacacggg ttccatggtg	20
<210> 19 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Праймер для ампліфікації	
<400> 19 gttgtgcaat ggcaattctg a	21
<210> 20 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Праймер для ампліфікації	
<400> 20 tctgacagtg catcatcgct g	21
<210> 21 <211> 19 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Праймер для ампліфікації	
<400> 21 gaacgggaag ctcaactggc	19
<210> 22 <211> 20 <212> ДНК	

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> праймер для ампліфікації
 <400> 22
 gcatgtcaga tccacaacgg 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> праймер для ампліфікації
 <400> 23
 gggtccagag gccaaacatc 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> праймер для ампліфікації
 <400> 24
 gttgccacat tgaccgtgac 20
 <210> 25
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Кодуюча послідовність для CDR
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n є a, c, g, або t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n є a, c, g, або t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n є a, c, g, або t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n є a, c, g, або t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n є a, c, g, або t
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (18)..(18)
<223> n є a, c, g, або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n є a, c, g, або t

<400> 25
wsngcnwsnw snwsngtnws ntayatgtay

30

<210> 26
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Кодуюча послідовність для CDR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n є a, c, g, або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n є a, c, g, або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n є a, c, g, або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n є a, c, g, або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n є a, c, g, або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n є a, c, g, або t

<400> 26
mgnacnwsna ayutngcnws n

21

<210> 27
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Кодуюча послідовність для CDR

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> n є a, c, g, або t

<400> 27
 carcartayc arwsnytncc nytnacn

27

<210> 28
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Кодуюча послідовність для CDR

<400> 28
 gaytaygara tgcaу

15

<210> 29
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Кодуюча послідовність для CDR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature

<222> (18)..(18)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n є a, c, g, або t

<400> 29
 gcngtngcnc cngaracngg nggnacngcn tayaaycara arttyaargg n

51

<210> 30
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Кодуюча послідовність для CDR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n є a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n є a, c, g, або t

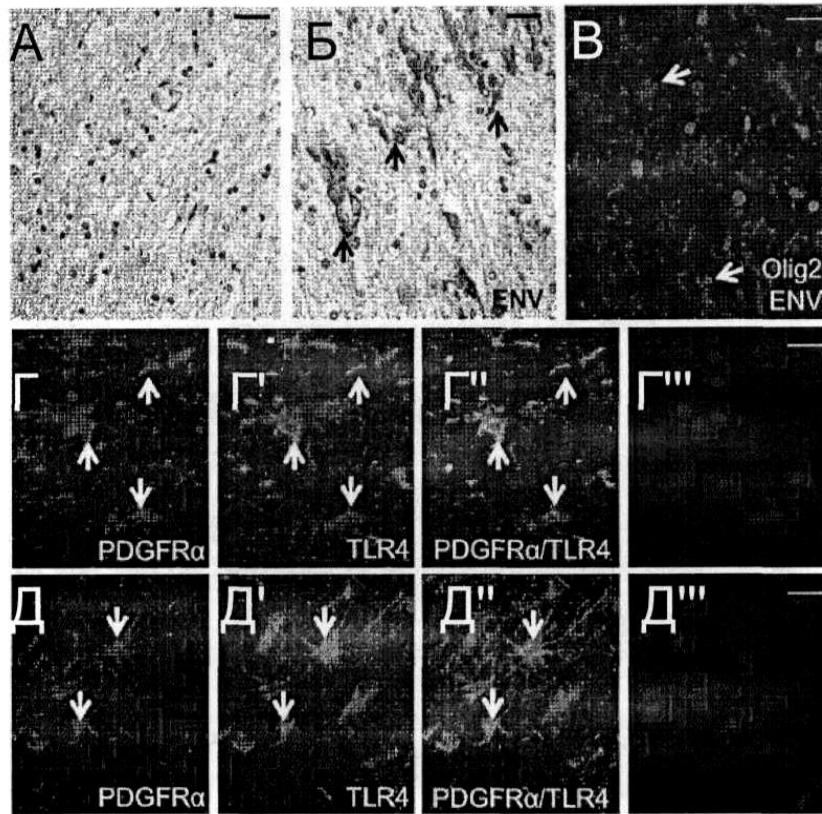
<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n є a, c, g, або t

<400> 30
 acngtngtnc cnttygcnta y

21

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Фармацевтична композиція, яка містить щонайменше ліганд анти-MSRV/HERV-W Env і щонайменше один лікарський засіб, що інгібує радикал окису азоту,
 5 де:
 - вказаний ліганд анти-HERV-W Env містить кожну з ділянок, що визначають комплементарність (CDR), зазначених в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 та SEQ ID NO: 6,
 - вказаний лікарський засіб, що інгібує радикали окису азоту, вибраний з групи, що складається
 10 з Ng-нітро-L-аргінінметилового ефіру (L-NAME), S-метилізотіосечовини (SMT) і диметилфумарату (DMF).
2. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що ліганд анти-MSRV Env є scFv, Fab-фрагментом або антитілом, більш переважно химерним, синтетичним або гуманізованим антитілом, і більш переважно IgG, таким як IgG1 або IgG4.
- 15 3. Фармацевтична композиція за п. 1 або 2, що застосовується для профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації при розсіяному склерозі (MS), переважно рецидивуючому ремітуючому розсіяному склерозі (RRMS), прогресуючому розсіяному склерозі, такому як вторинний прогресуючий розсіяний склероз (SPMS) або первинний прогресуючий розсіяний склероз (PPMS), хронічної запальної демієлінізуючої полінейропатії (CIDP), психічних розладах, таких як
 20 шизофренія або біполярні розлади, та інших демієлінізуючих захворюваннях, що пов'язані з експресією білка оболонки (Env) HERV-W.
4. Спосіб профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації при захворюваннях, що пов'язані з експресією білка оболонки (ENV) HERV-W, що включає введення щонайменше одного ліганду анти-HERV-W Env і щонайменше одного лікарського засобу, що інгібує радикали окису азоту,
 25 людині,
 де:
 - вказаний ліганд анти-HERV-W Env містить кожну з ділянок, що визначають комплементарність (CDR), зазначених в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 та SEQ ID NO: 6,
 30 - вказаний лікарський засіб, що інгібує радикали окису азоту, вибрано з групи, що складається з Ng-нітро-L-аргінін метилового ефіру (L-NAME), S-метилізотіосечовини (SMT), і диметилфумарату (DMF).
5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що ліганд анти-MSRV Env є scFv, Fab-фрагментом або антитілом, більш переважно химерним, синтетичним або гуманізованим антитілом, і більш
 35 переважно IgG, таким як IgG1 або IgG4.
6. Спосіб профілактики і/або лікування блокади ремієлінізації за п. 4 або 5 при розсіяному склерозі (MS), переважно рецидивуючому ремітуючому розсіяному склерозі (RRMS), прогресуючому розсіяному склерозі, такому як вторинний прогресуючий розсіяний склероз (SPMS) або первинний прогресуючий розсіяний склероз (PPMS), хронічній запальній
 40 демієлінізуючій полінейропатії (CIDP), психічних розладах, таких як шизофренія або біполярні розлади, та інших демієлінізуючих захворюваннях, що пов'язані з експресією білка оболонки (ENV) HERV-W.

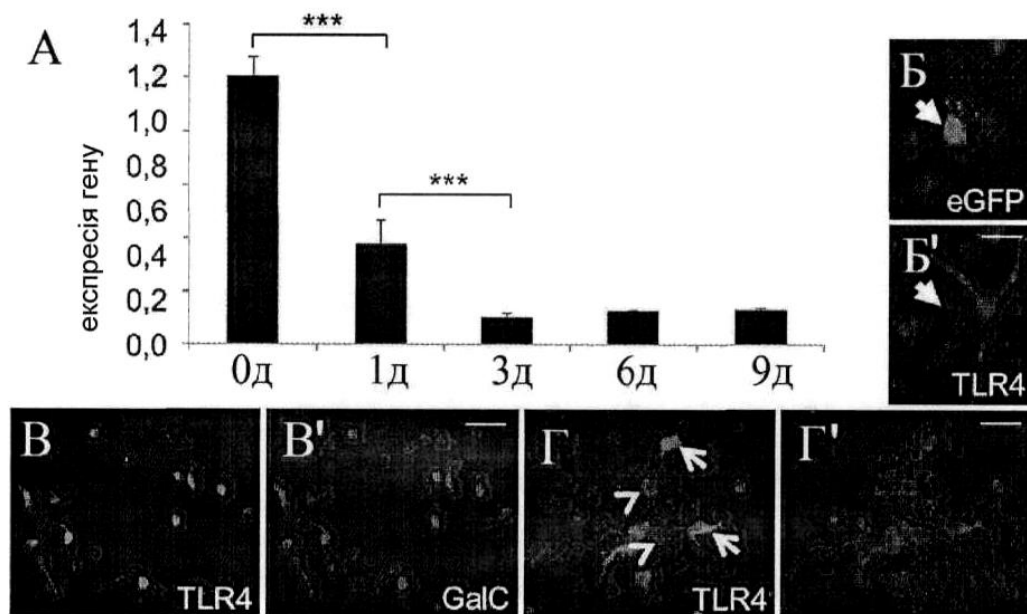


ENV – білок оболонки

PDGFR α - рецептор до фактора росту тромбоцитів α

TLR4 - толл-подібний рецептор 4

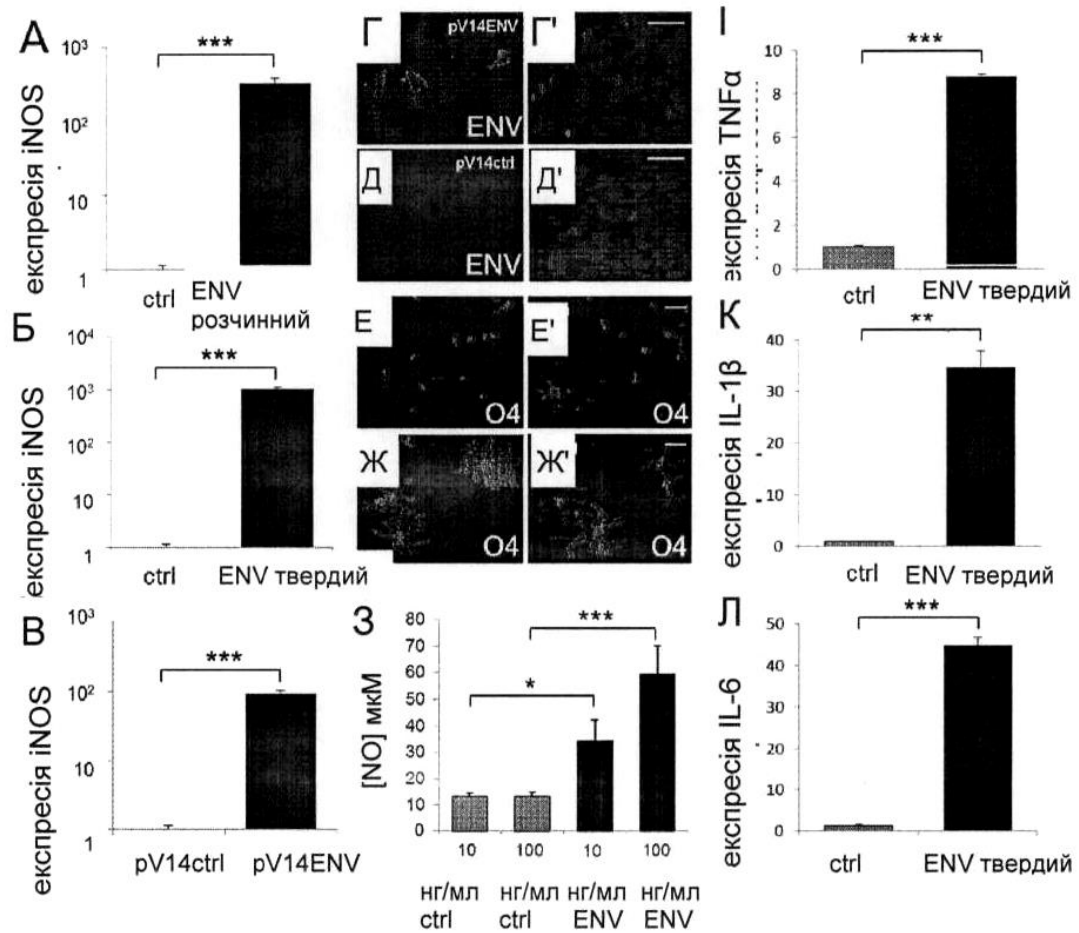
ФІГ. 1



GalC – галактоцереброзидаза

eGFP - зелений флуоресцентний білок

ФІГ. 2



NO - оксид азоту

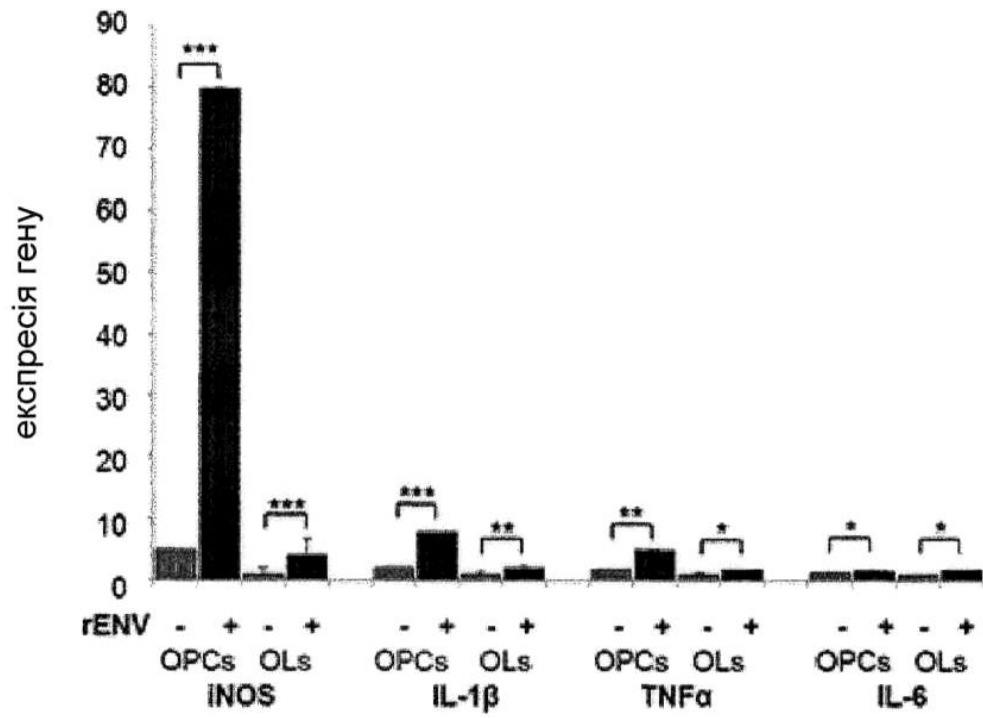
iNOS - індукційна синтаза оксиду азота

TNF - фактор некрозу пухлини

IL – інтерлейкін

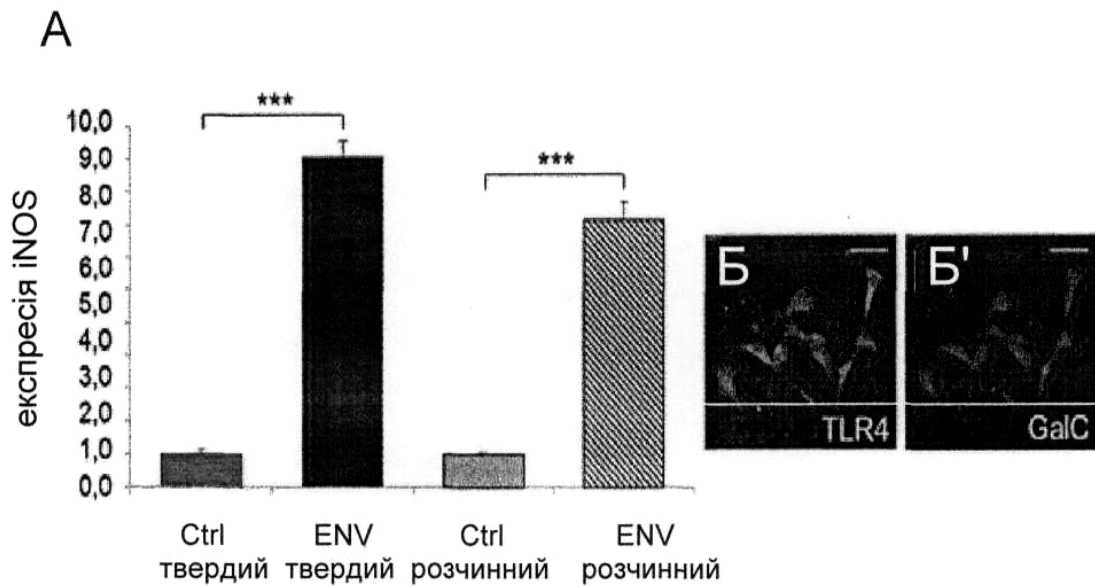
Ctrl – контроль

ФІГ. 3

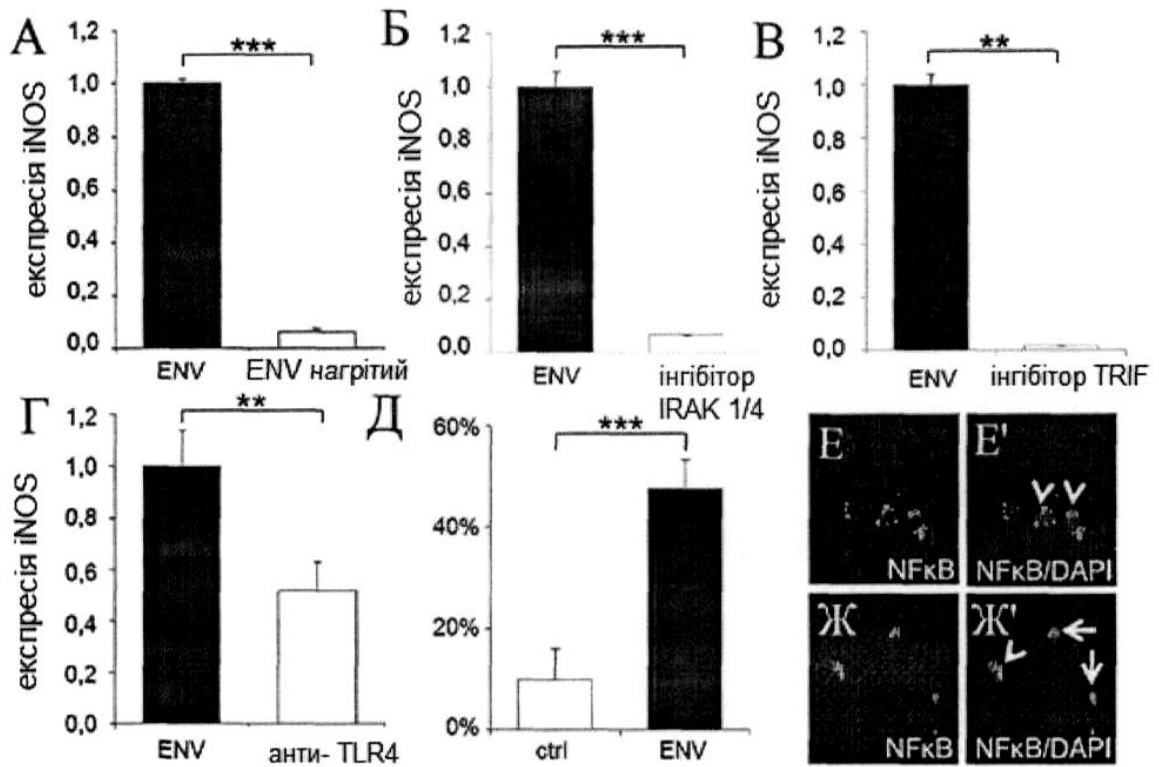


OPCs - клітини попередники олігодендроцитів
OL - олігодендроцити

ФІГ. 4



ФІГ. 5

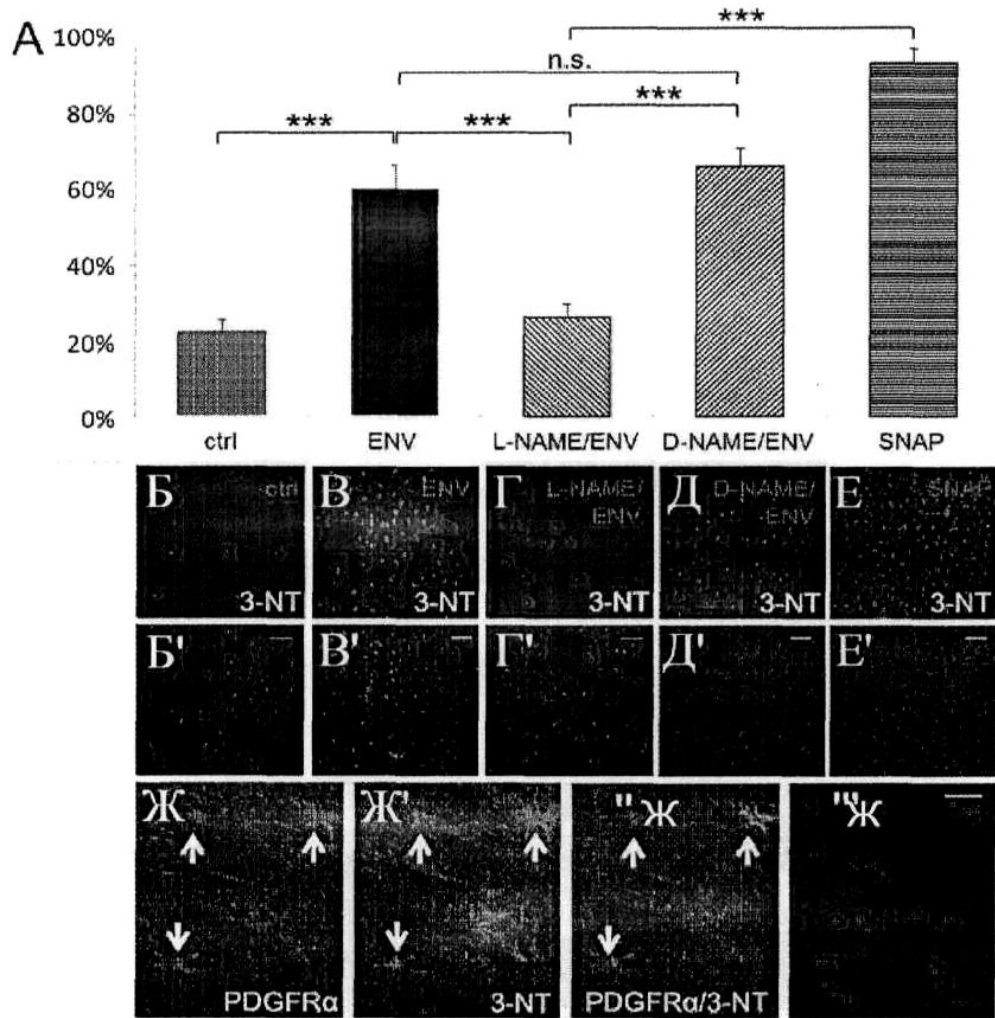


IRAK 1/4 - кінза, що асоційована з рецептором інтерлейкін-1 1/4

DAPI – 4',6- діаміно-2-феніліндол

NFκB - ядерний фактор енхансер легкого ланцюга типу κ активованих В-клітин

ФІГ. 6



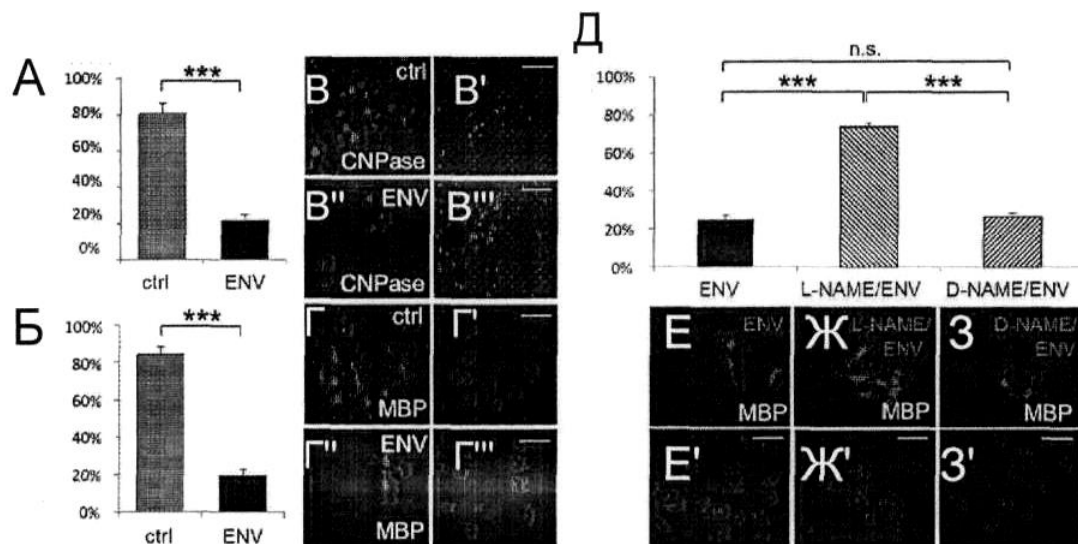
L-NAME - L-N^G нітроаргініну метиловий ефір

D-NAME - D-N^G нітроаргініну метиловий ефір

SNAP - S-нітрозо-N-ацетил-DL-пеніциламін

3-NT - 3-нітротірозин

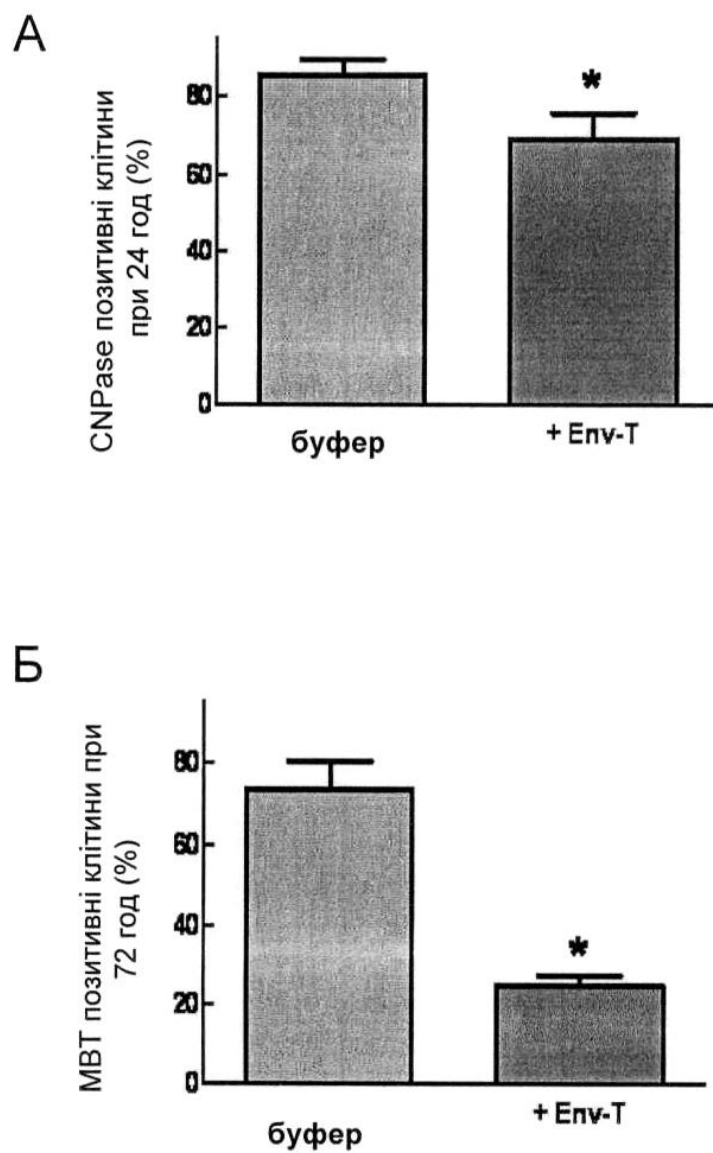
ФІГ. 7



MBP - основний білок мієліну

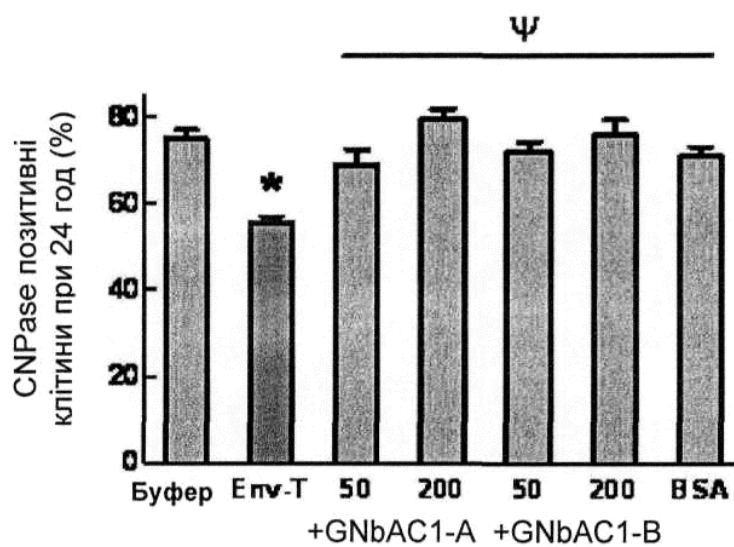
CNPase - 3'-фосфодієстераза циклічних нуклеотидів

ФІГ. 8

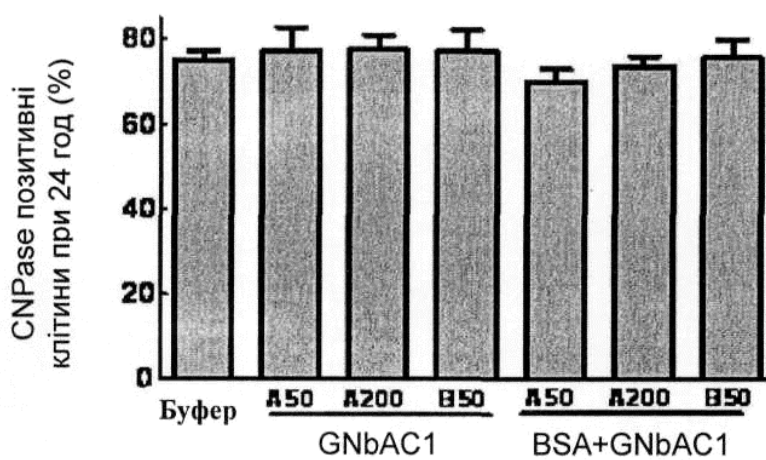


ФІГ. 9

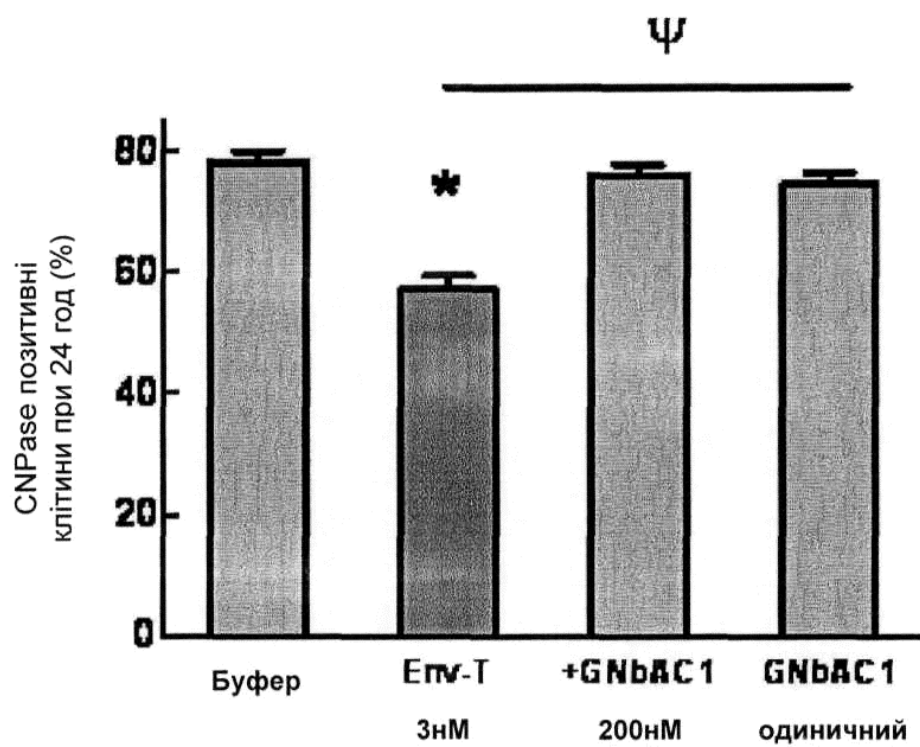
А



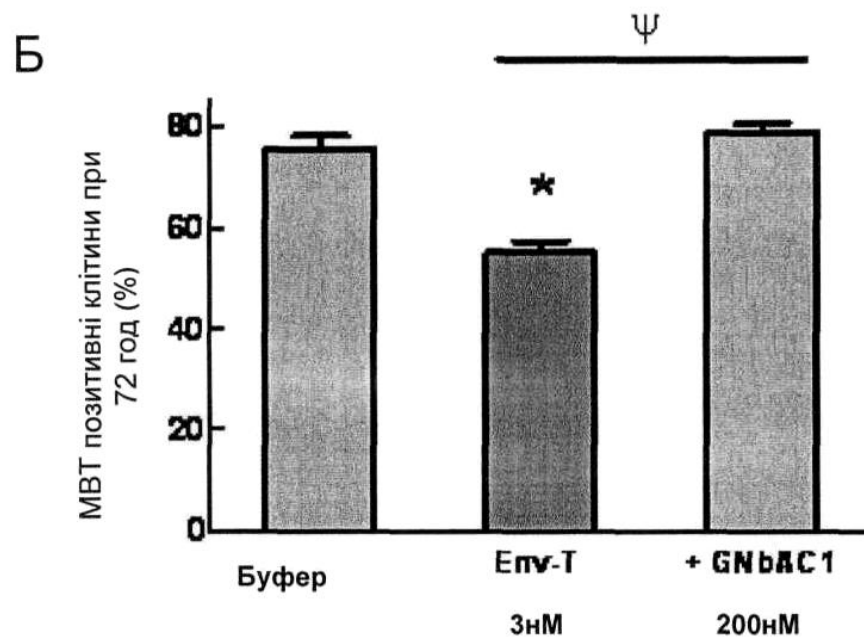
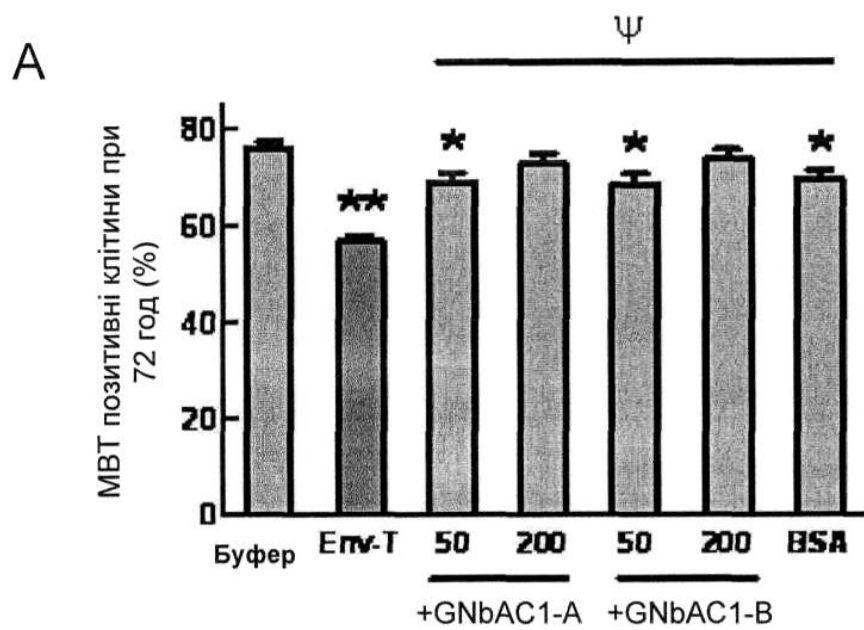
Б



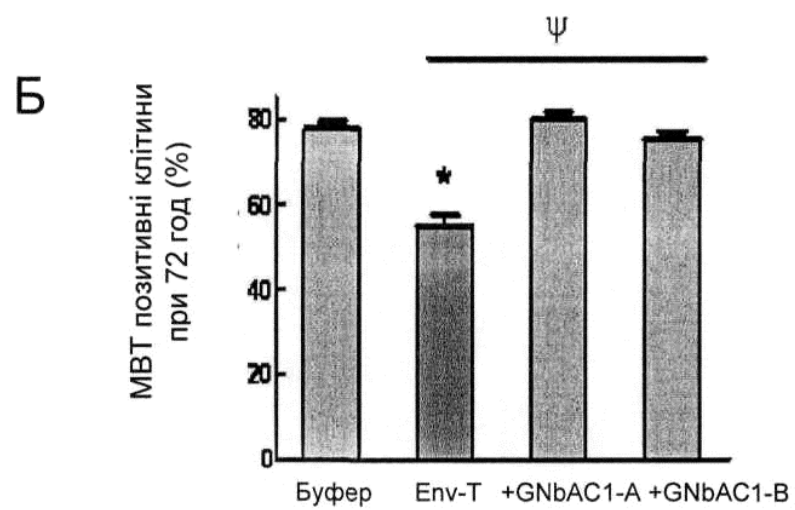
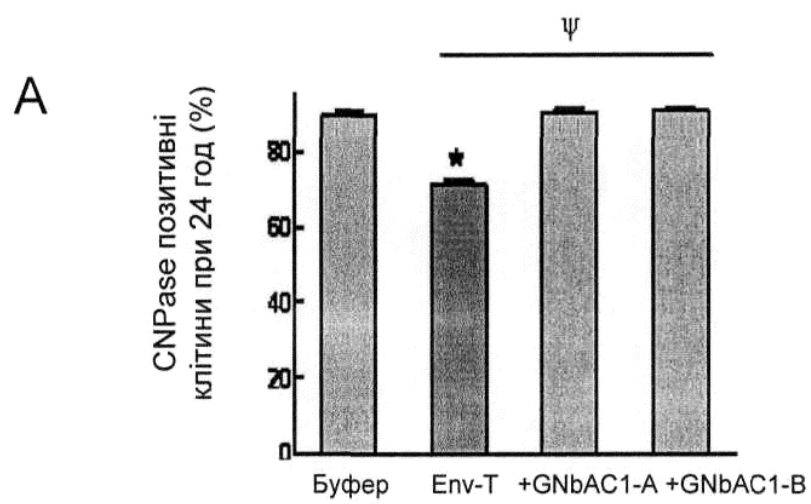
ФІГ. 10



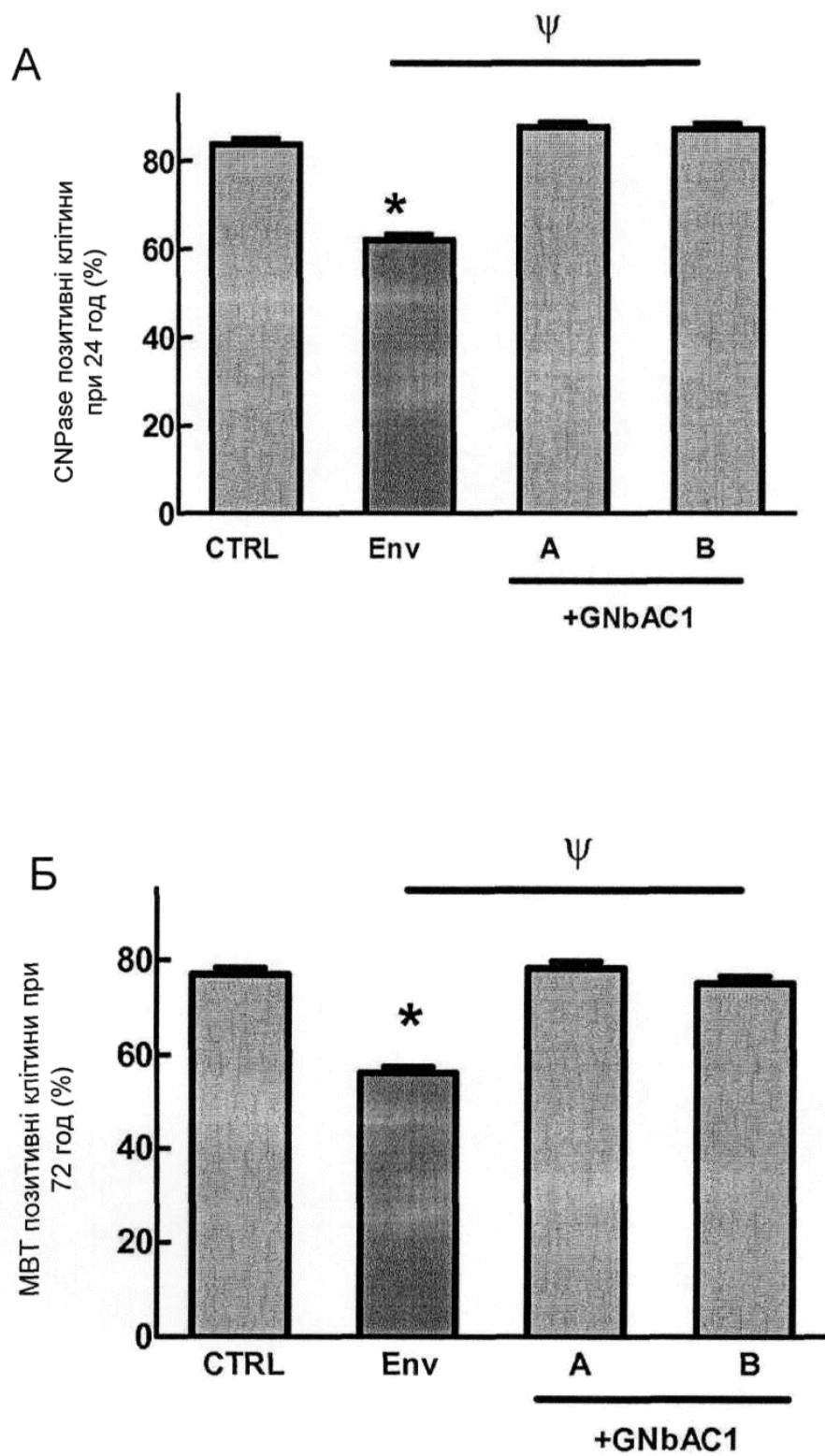
ФІГ. 11



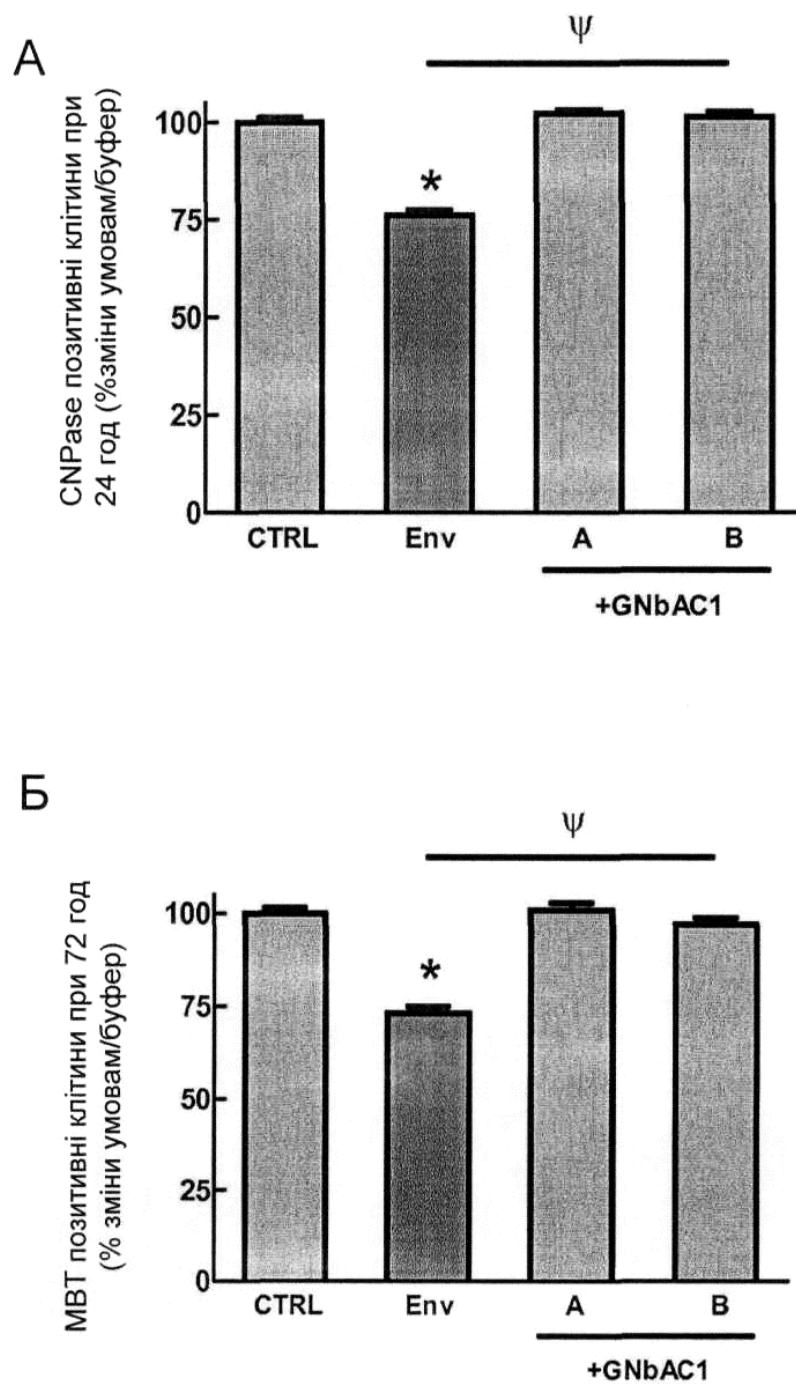
ФІГ. 12



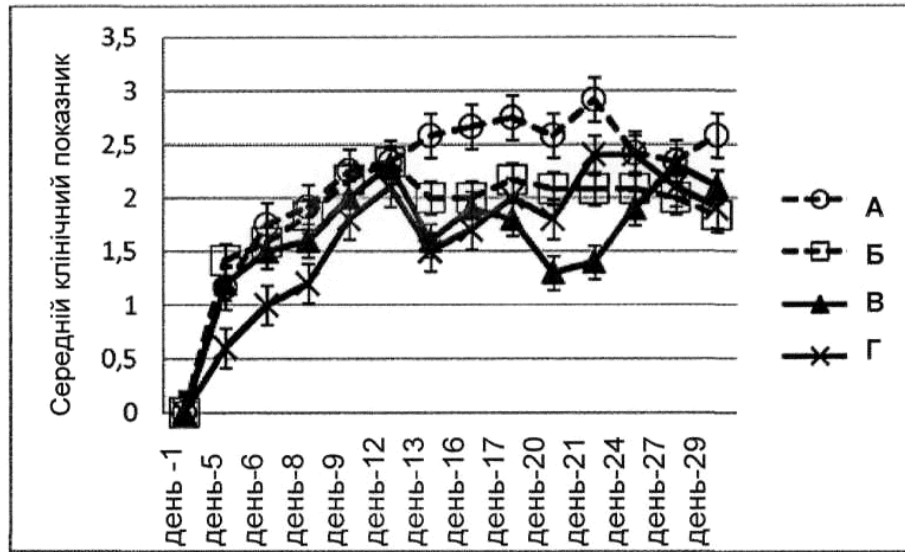
ФІГ. 13



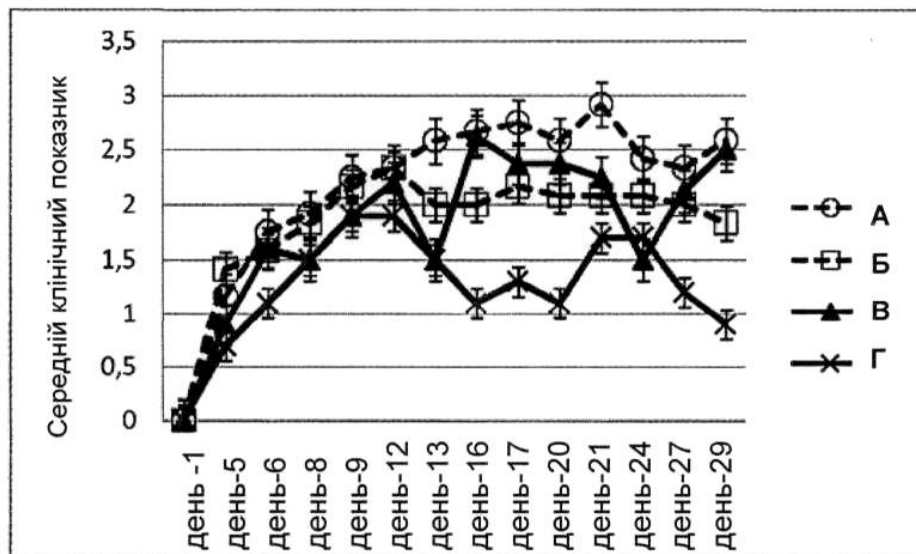
ФІГ. 14



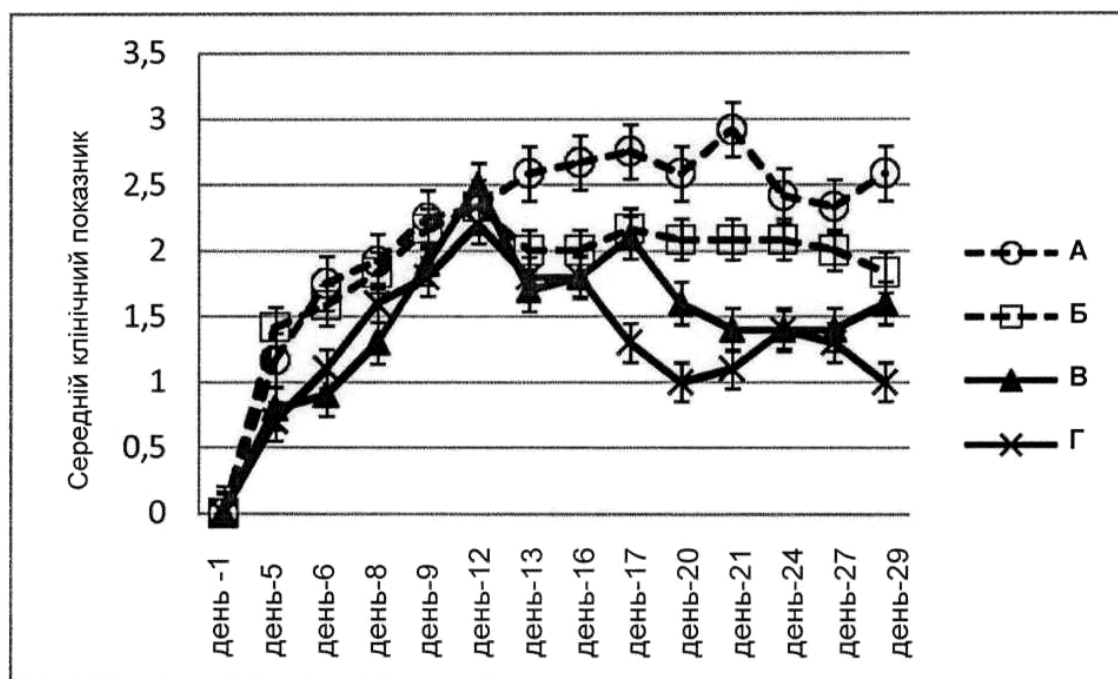
ФІГ. 15



ФІГ. 16

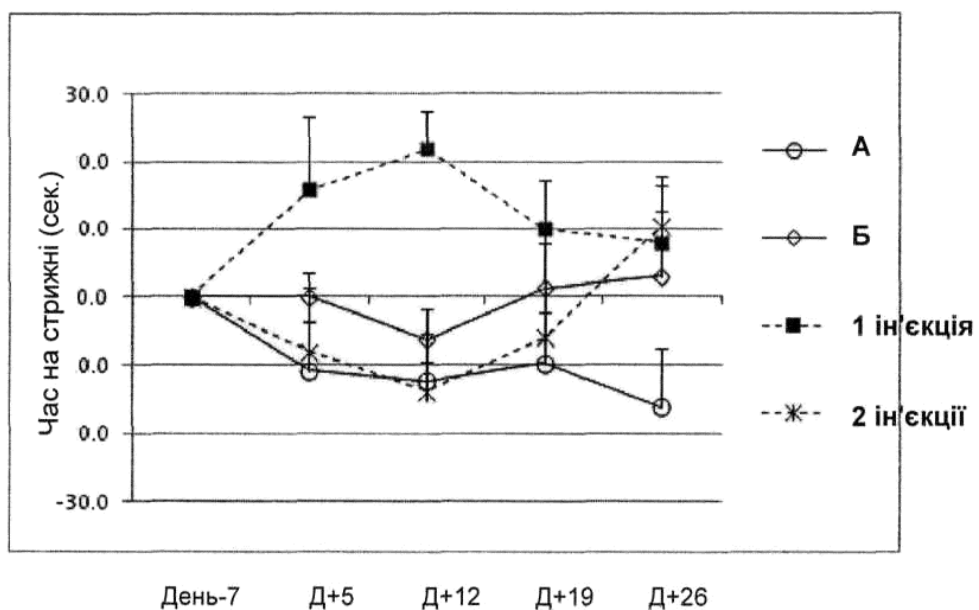


ФІГ. 17

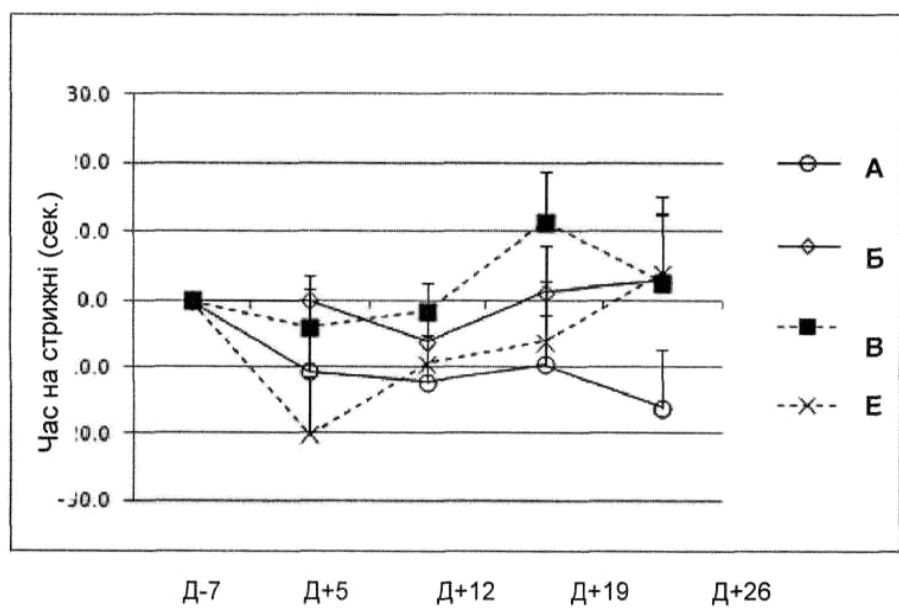


ФІГ. 18

А

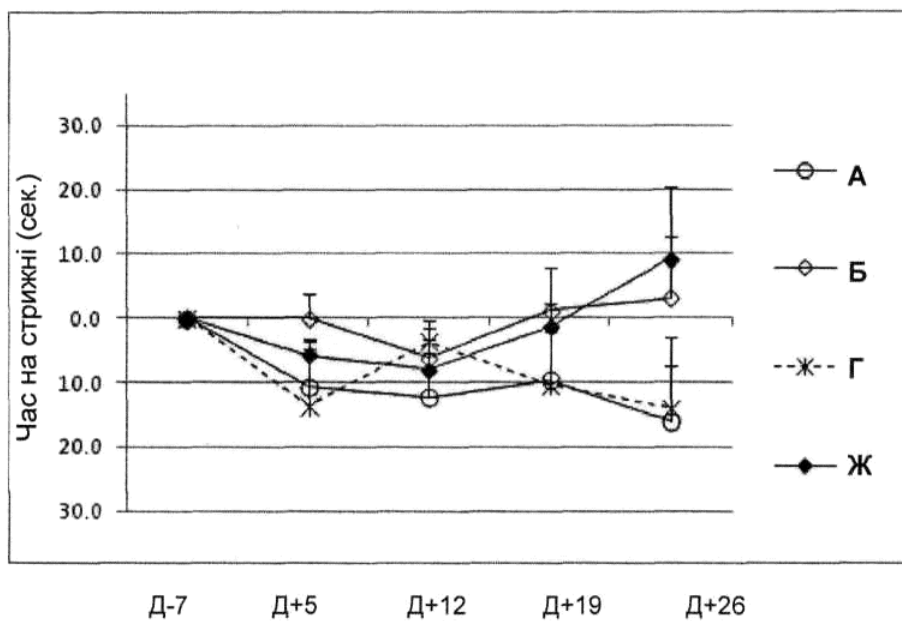


Б

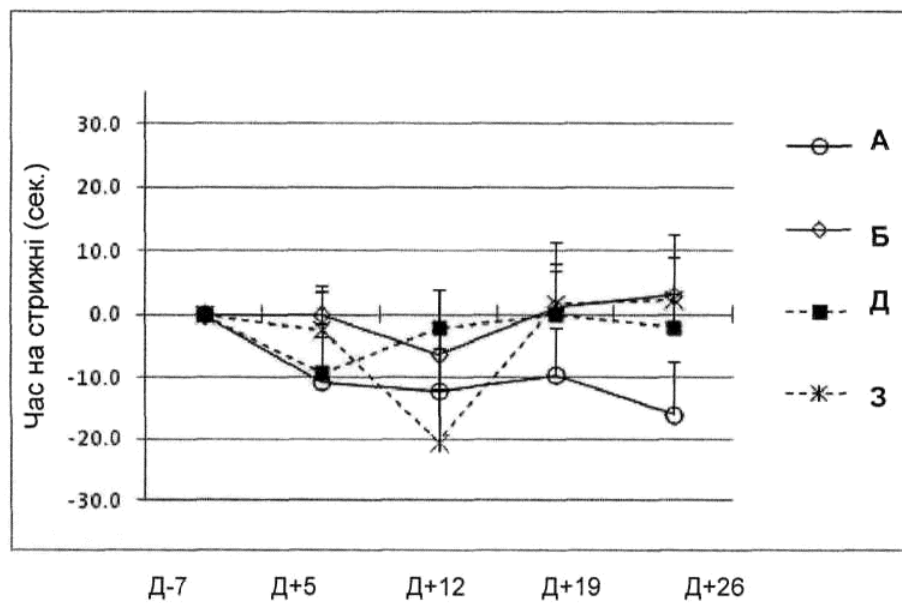


ФІГ. 19

В

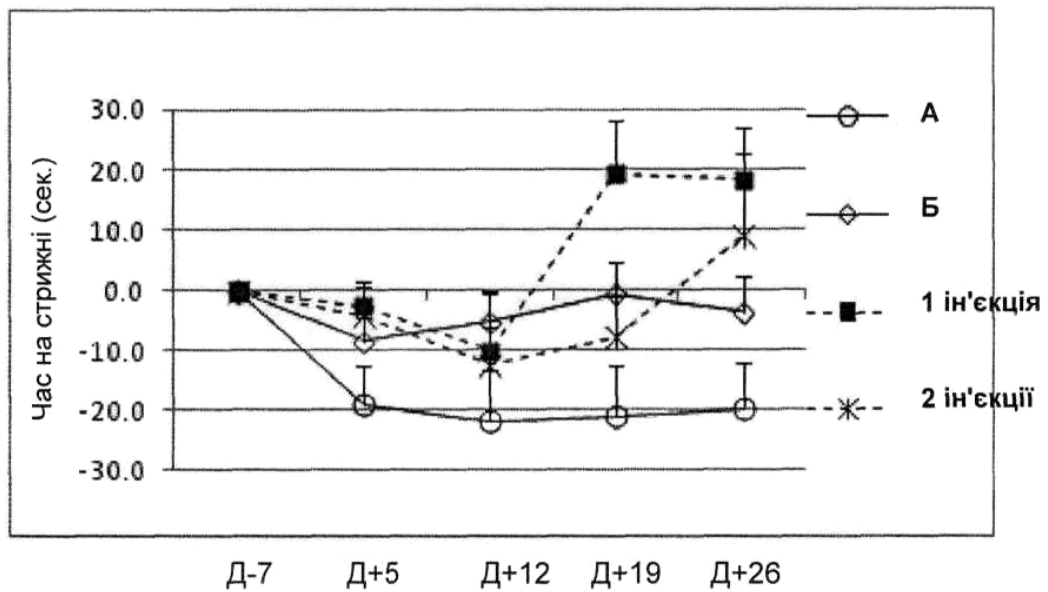


Г

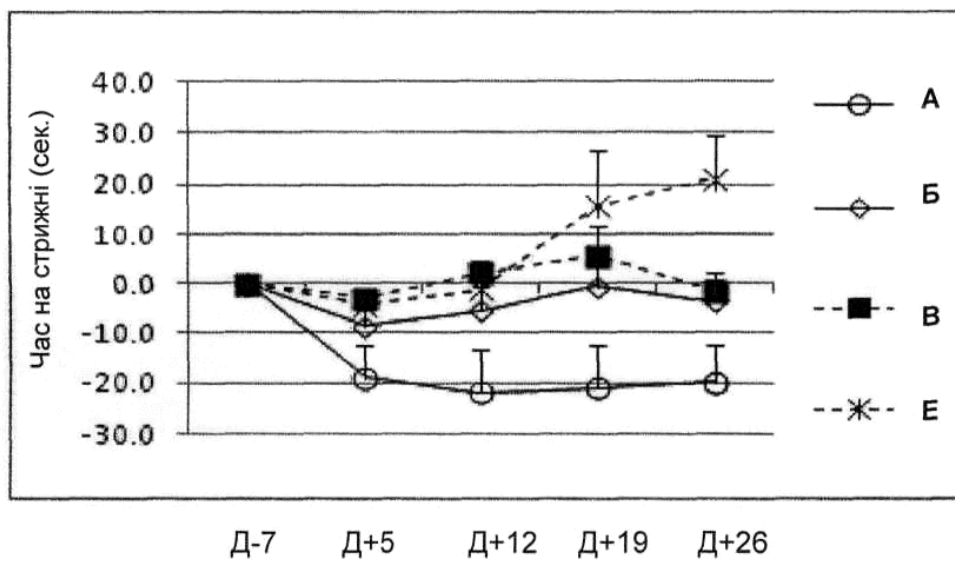


ФІГ. 19 (продовж.)

А

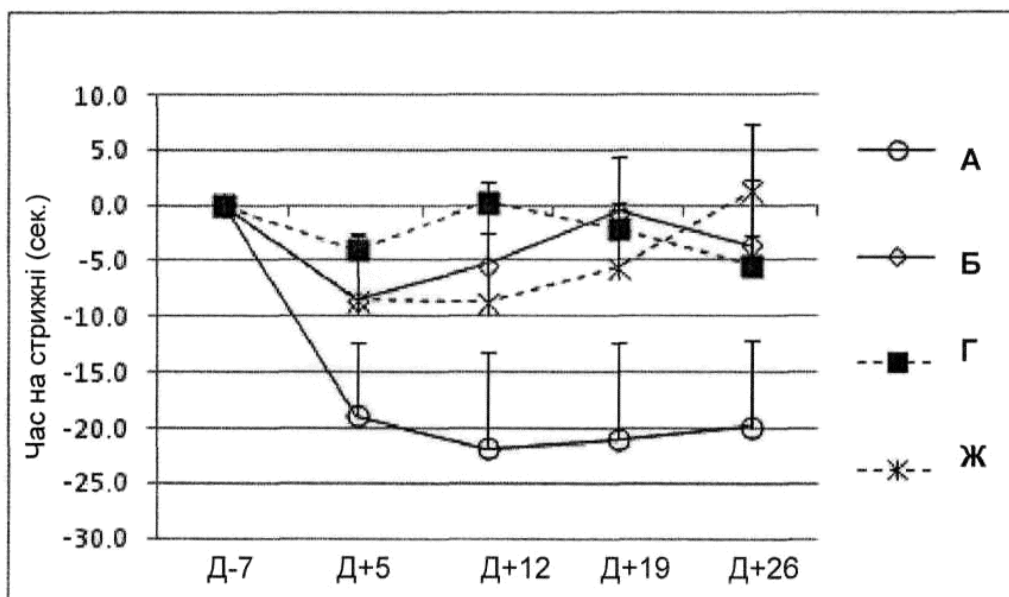


Б

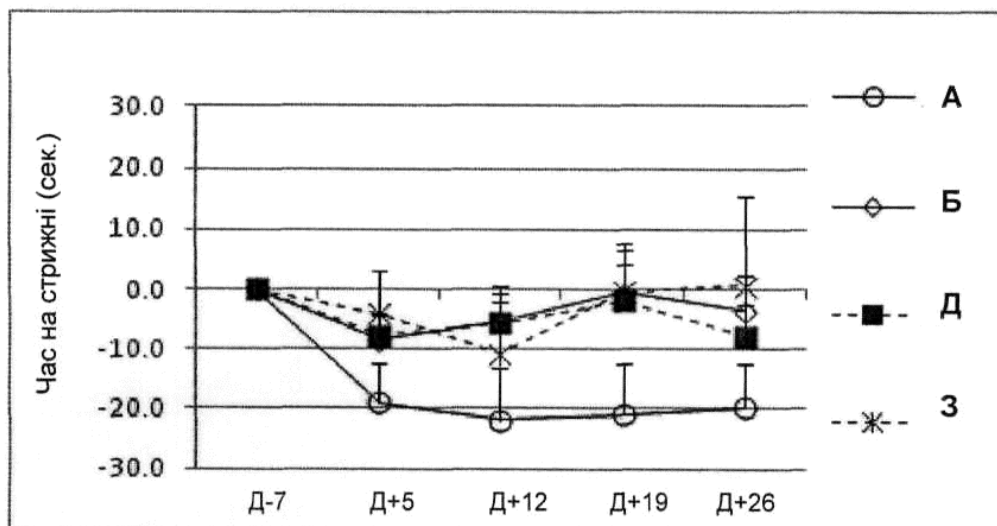


ФІГ. 20

В

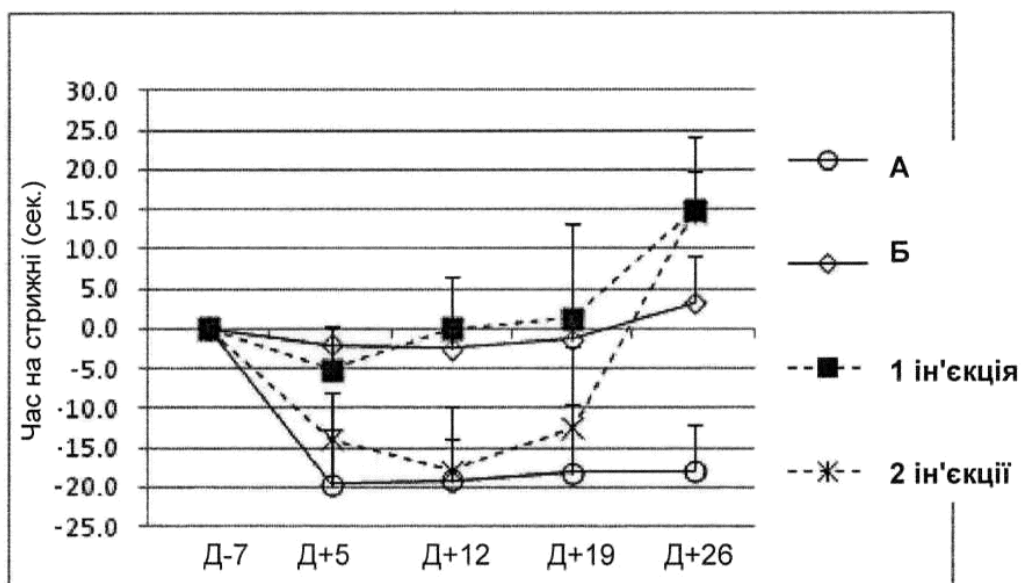


Г

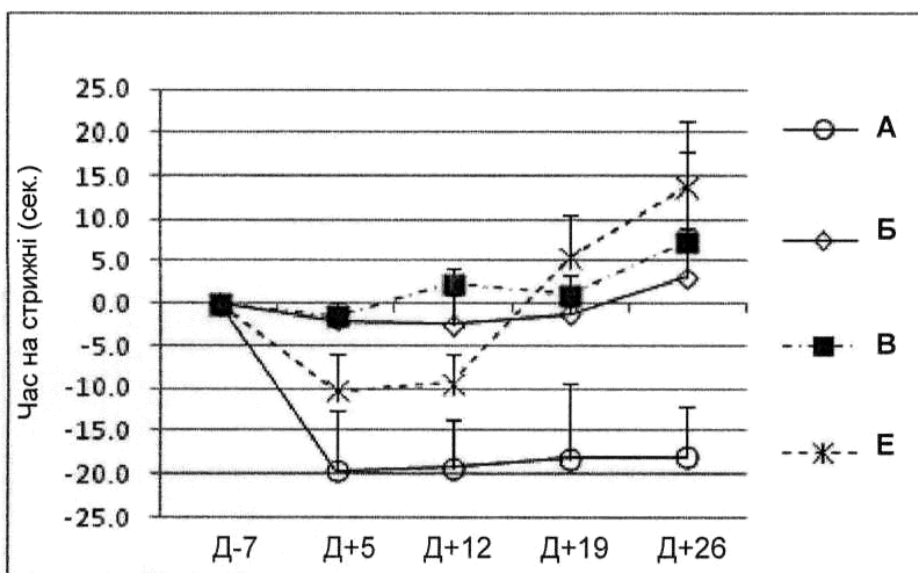


ФІГ. 20 (продовж.)

А

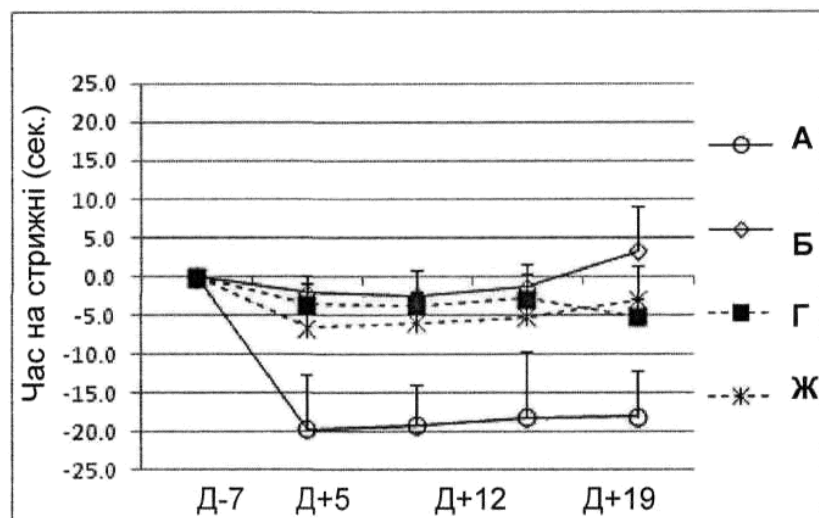


Б

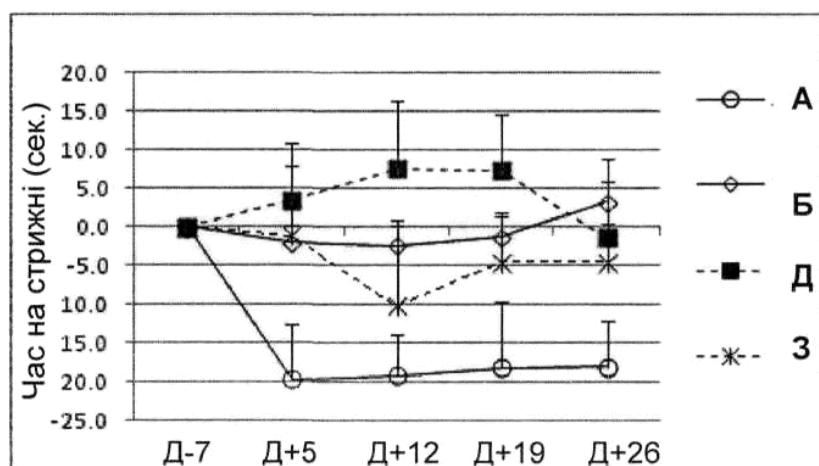


ФІГ. 21

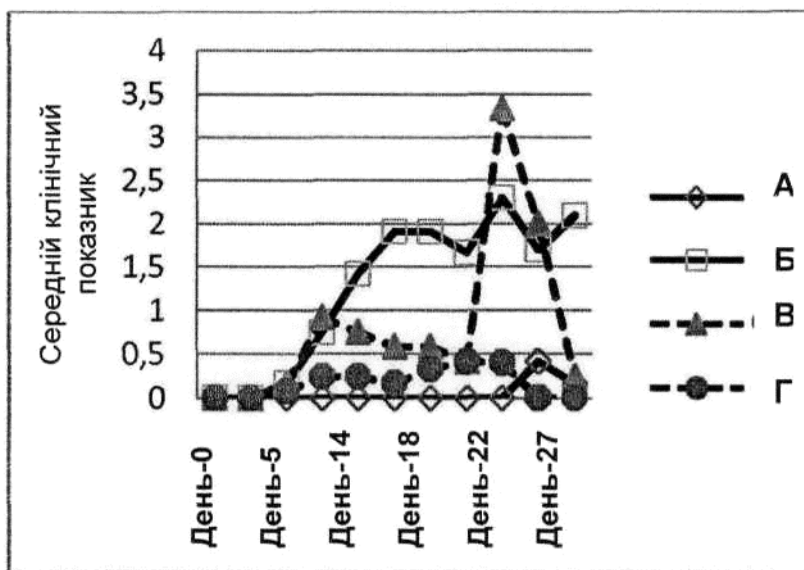
В



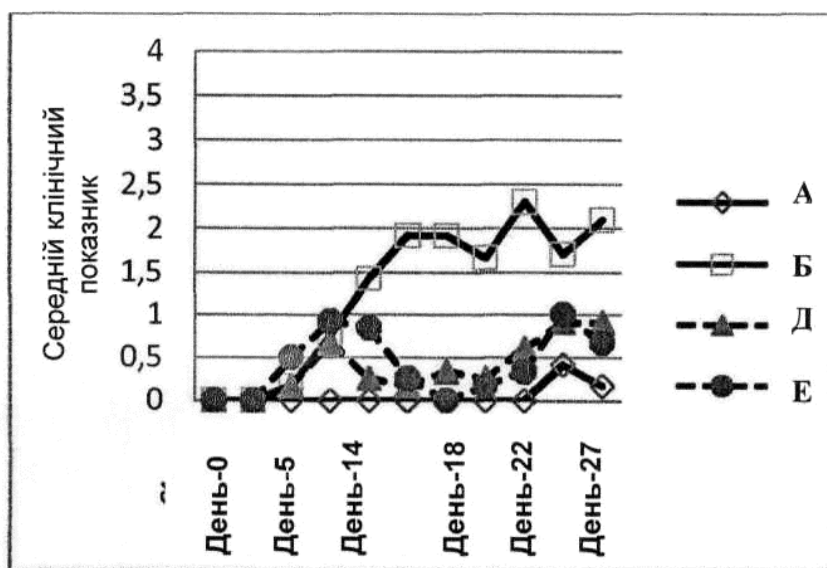
Г



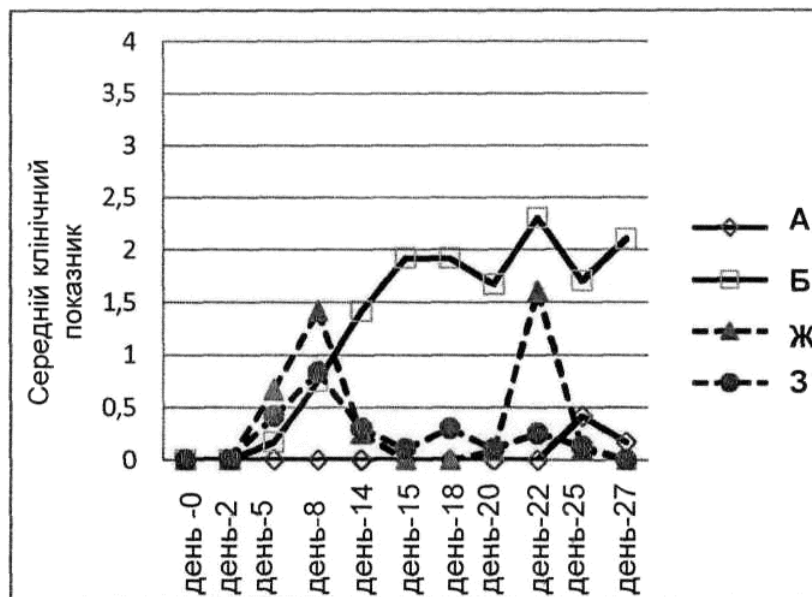
ФІГ. 21 (продовж.)



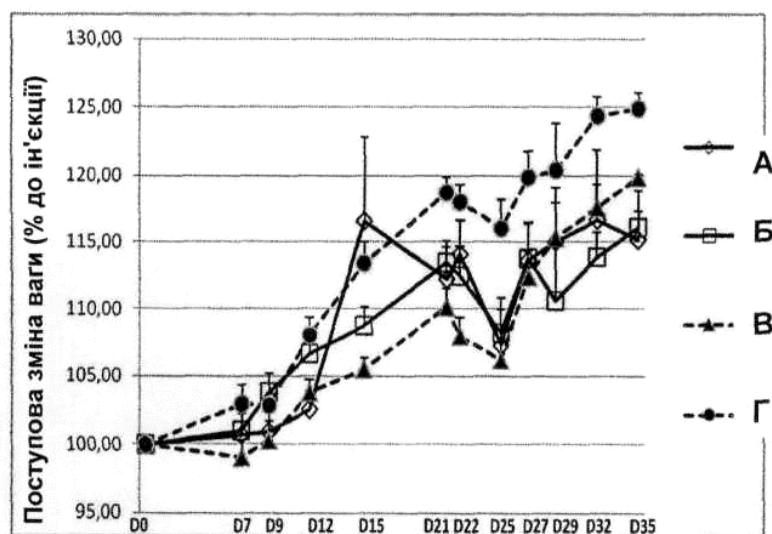
ФІГ. 22



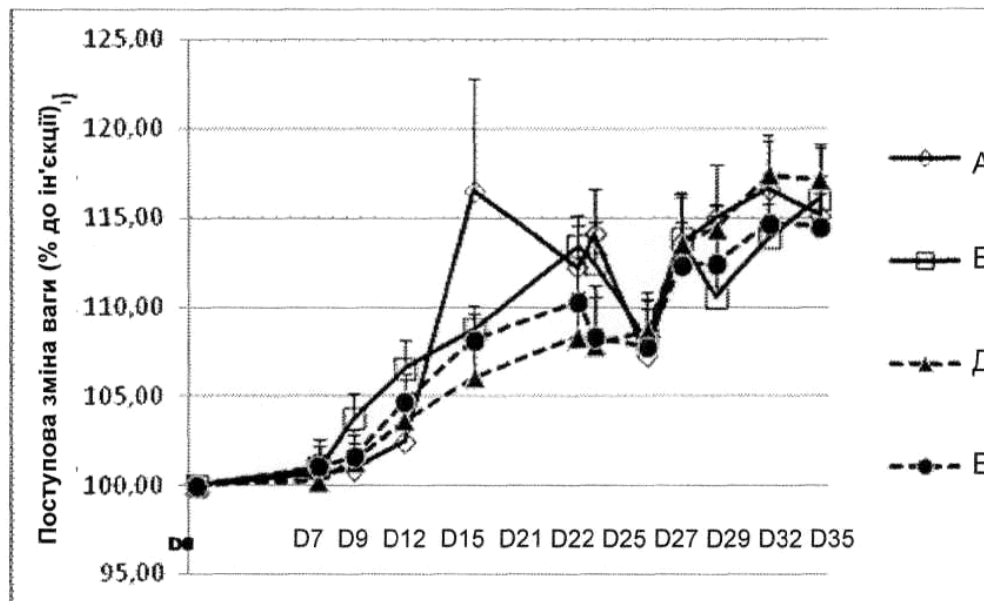
ФІГ. 23



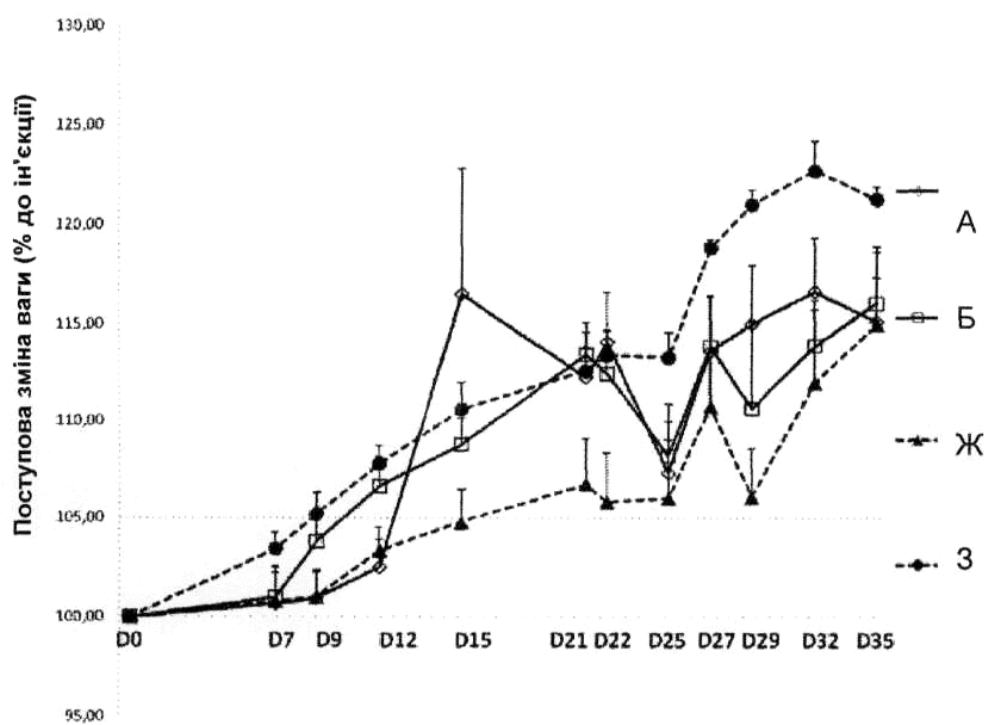
ФІГ. 24



ФІГ. 25

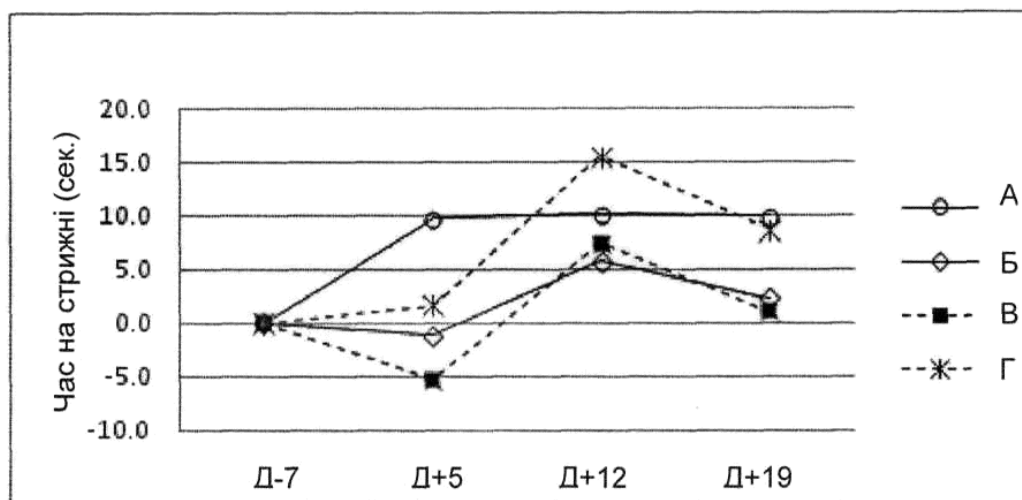


ФІГ. 26

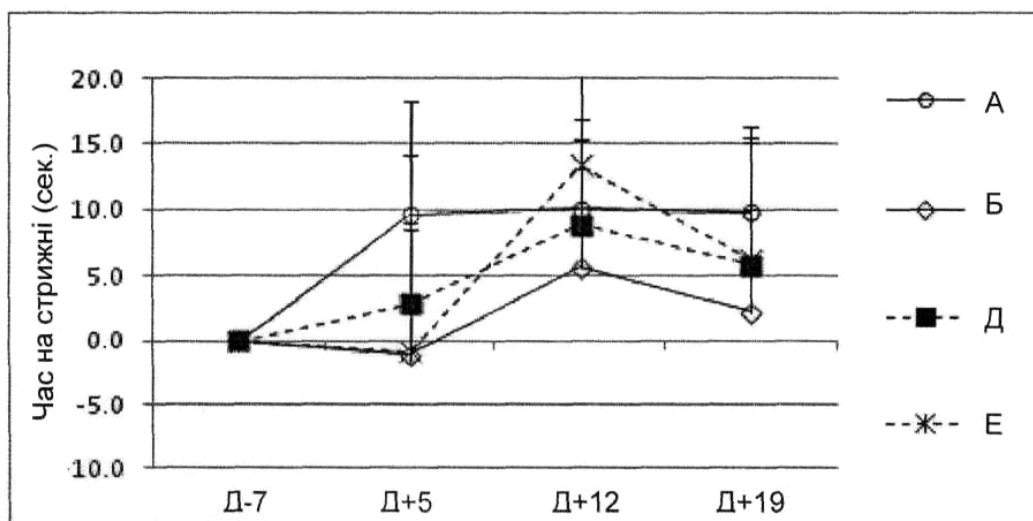


ФІГ. 27

А

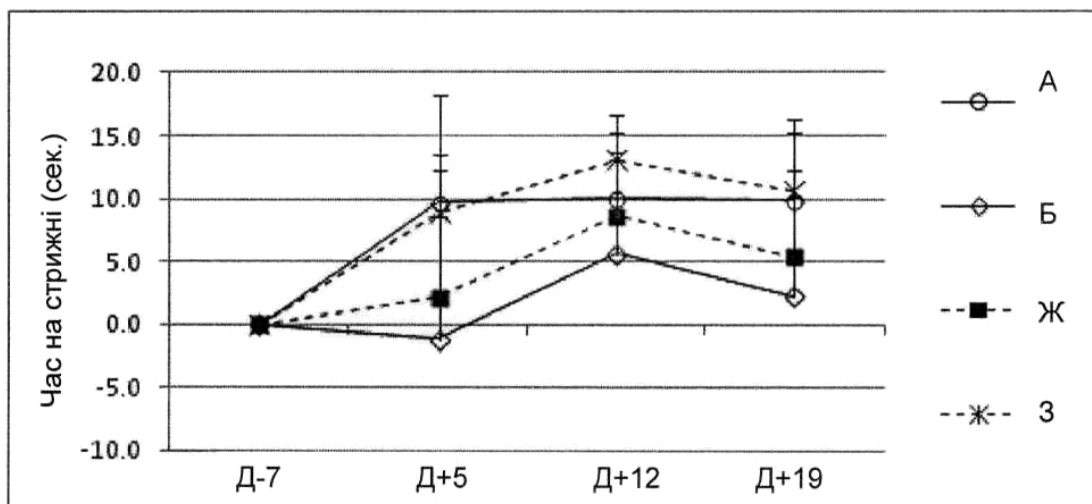


Б



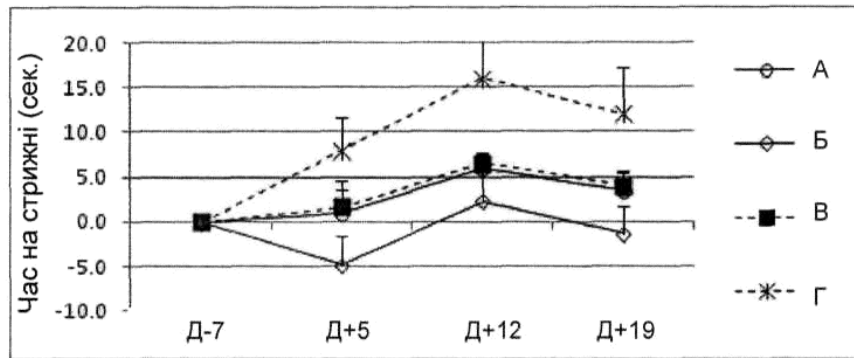
ФІГ. 28

B

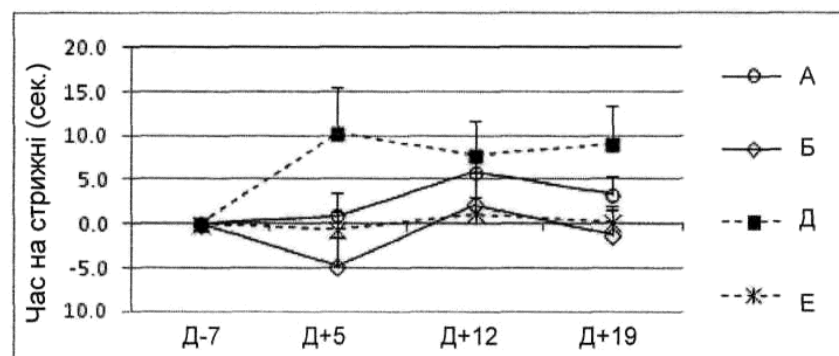


ФІГ. 28 (продовж.)

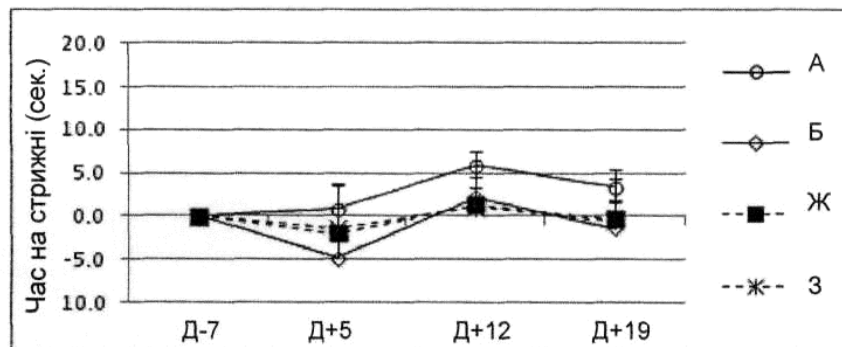
А



Б

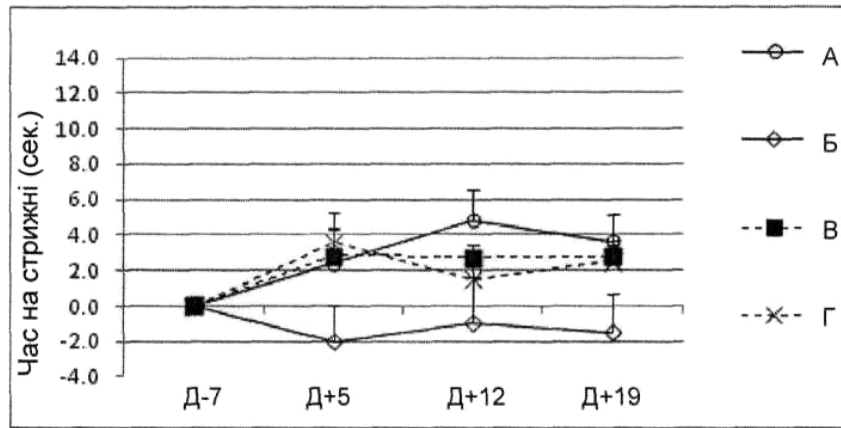


В

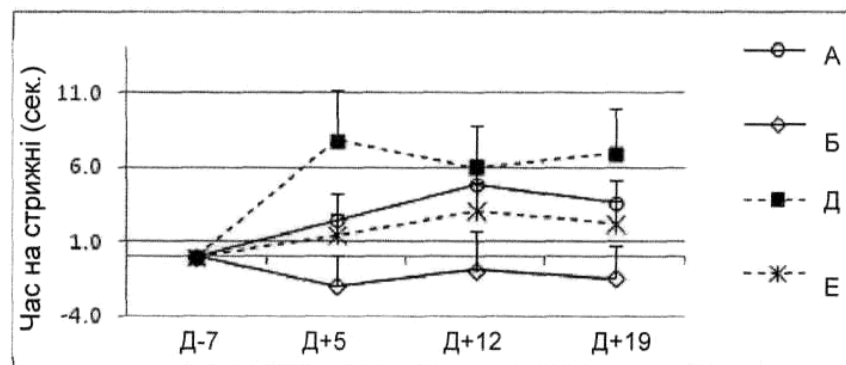


ФІГ. 29

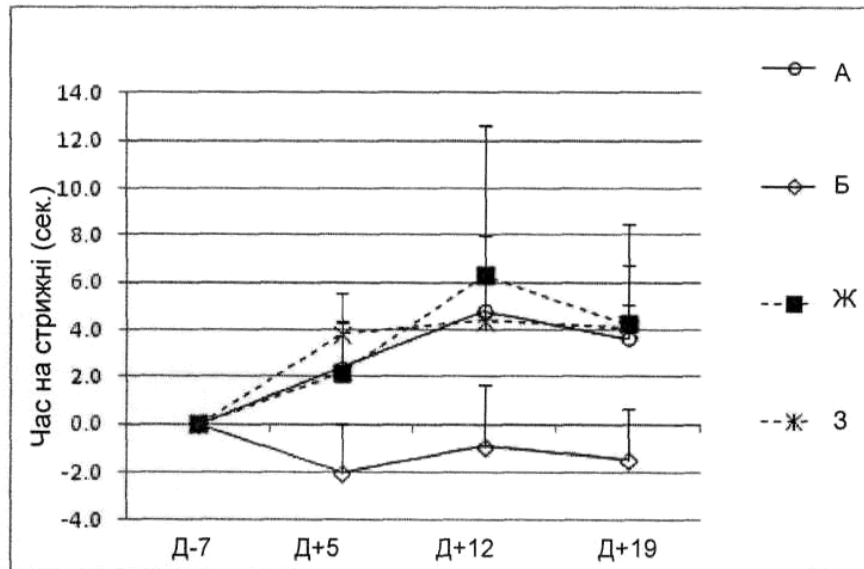
А



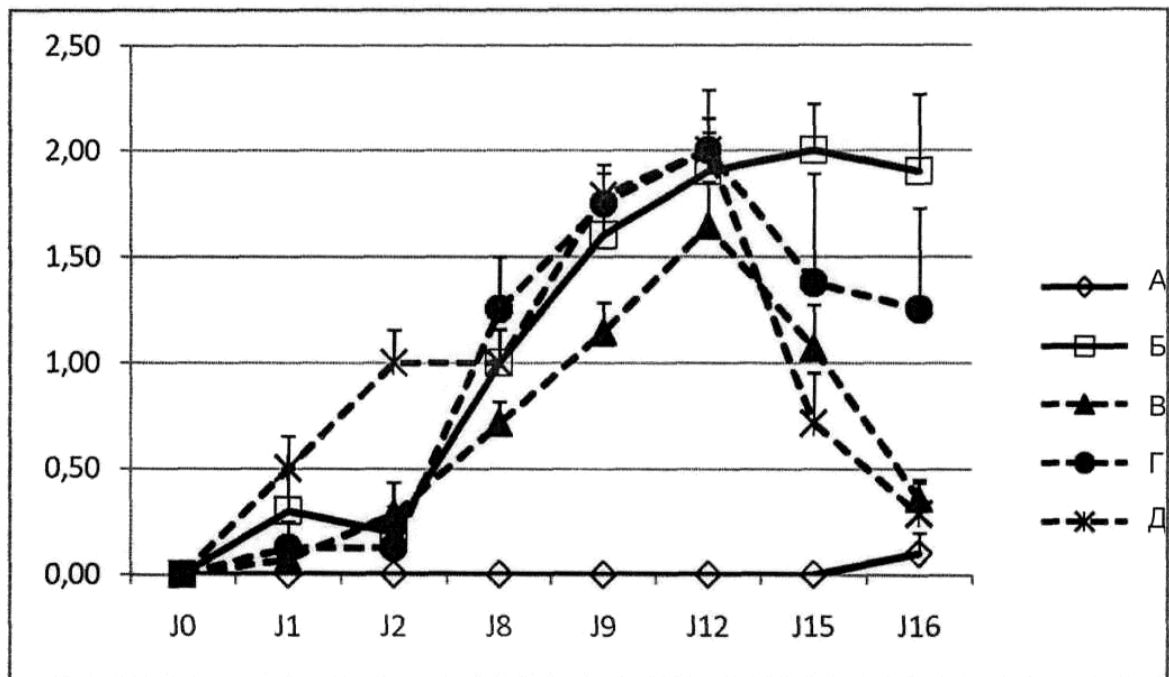
Б



В



ФІГ. 30



ФІГ. 31

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601