

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034612**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.27

(51) Int. Cl. **A61K 39/42** (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

(21) Номер заявки
201692471

(22) Дата подачи заявки
2015.05.27

(54) КОМБИНАЦИЯ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ, АССОЦИИРОВАННОГО С HERV-W, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 14305806.3

(32) 2014.05.28

(33) EP

(43) 2017.04.28

(86) PCT/EP2015/061691

(87) WO 2015/181226 2015.12.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЖЕНЁРО СА (CH)

(72) Изобретатель:
**Перрон Эрве (FR), Кюртен Франсуа,
Ланг Алоис (CH), Фокар Рафаэль,
Медина Жюли, Мадейра Александра,
Жээн Надеж (FR)**

(74) Представитель:
**Саломатина И.С., Фелицына С.Б.
(RU)**

(56) WO-A1-2014053489
WO-A1-2010003977
FR-A1-2865403
FR-A1-2912314
WO-A2-03027247

DERFUSS TOBIAS ET AL.: "A phase IIa randomised clinical study of GNbAC1, a humanised monoclonal antibody against the envelope protein of multiple sclerosis-associated endogenous retrovirus in multiple sclerosis patients", MULTIPLE SCLEROSIS (HOUNDMILLS, BASINGSTOKE, ENGLAND), APR 2012, vol. 21, no. 7, 20 May 2015 (2015-05-20), pages 885-893, XP009185576, ISSN: 1477-0970, DOI: 10.1177/1352458514554052, abstract, figures 1-3, table 1-3, pages 888-893

US-A1-2012321637

TOVE CHRISTENSEN: "HERVs in Neuropathogenesis", JOURNAL OF NEUROIMMUNE PHARMACOLOGY, vol. 5, no. 3, 27 April 2010 (2010-04-27), pages 326-335, XP055152031, ISSN: 1557-1890, DOI: 10.1007/s11481-010-9214-y, whole document, in particular, pages 329-331, table 3

(57) Изобретение предусматривает комбинацию для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с HERV-W, которая включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против белка оболочки HERV-W (HERV-W Env), содержащие три CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, и три CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и лекарственное средство - ингибитор ретровирусной обратной транскриптазы. Изобретение также предусматривает применение предложенной комбинации для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с HERV-W, и способ предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с HERV-W, включающий введение предложенной комбинации.

B1

034612

034612 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новому антиретровирусному лекарственному средству, нацеленному на эндогенный ретровирус человека.

Предшествующий уровень техники

Эндогенные ретровирусы человека (HERV) являются сложными и гетерогенными многокопийными семействами генетических элементов, которые представляют собой остатки предковых ретровирусных инфекций, вошедших в геном некоторых видов посредством вставок в зародышевых клетках. В целом HERV элементы составляют около 8% человеческого генома и, если HERV-элементы сохранили транскрипционную активность, редко вызывают полную экспрессию ретровирусного генома, и почти не ожидается, что она происходит из полностью функциональных провирусных копий.

Ретровирусный элемент, ассоциированный с рассеянным склерозом (MSRV), который является представителем семейства эндогенных ретровирусов W-типа (HERV-W), впервые был выделен из клеток пациентов, страдающих от рассеянного склероза. MSRV обычно скрыт в геноме индивидуумов, но при срабатывании кофакторов, таких как некоторые распространенные вирусы, он может быть реактивирован и может в дальнейшем экспрессировать белок оболочки семейства HERV-W. Авторы изобретения ранее исследовали этот механизм и продемонстрировали, что он является одним из основных факторов запуска и усиления развития и прогрессии различных заболеваний, таких как рассеянный склероз (MS), шизофрения (SZ), биполярное расстройство (BP), однополярная или психотическая депрессия, клинически изолированный синдром (CIS, с неврологическим симптомом), хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), эпилепсия, псориаз, рак, воспалительные панкреатит и сахарный диабет, например диабет 1- или 2-го типа.

Несмотря на возможную экспрессию всех структурных ретровирусных генов HERV, т.е. матрицы, кодируемой геном gag, полипротеина-прекурсора капсида и нуклеокапсида, вместе с ретровирусными ферментами, кодируемыми геном pol, включая полипротеин-прекурсор протеазы, обратной транскриптазы и интегразы, и вместе с геном env, кодирующим белок-прекурсор оболочки того же HERV, до сегодняшнего дня инфекционная ретровирусная копия HERV не была обнаружена.

Кроме того, в отличие от экзогенных инфекционных ретровирусов, HERV присутствуют в ДНК всех клеток каждого человеческого индивидуума, и, следовательно, терапевтические молекулы, классически используемые для лечения ретровирусов человека, не могут устранить соответствующий провирус в субпопуляции резервуарных клеток. Множество клеточных и генетических ограничений этих эндогенных элементов также делают их контролируемые неретровирусными молекулярными механизмами, что, таким образом, позволяет избежать классических ретровирусных путей. Среди этих различных механизмов известно вовлечение генного сайленсинга, генного контроля клеточным промотором/энхансером или генетической рекомбинацией между HERV-последовательностями и клеточными генами. Такие особенности не ожидаются в случае классических экзогенных ретровирусов и, следовательно, не доступны для существующей в настоящее время антиретровирусной терапии.

В таких условиях нельзя ожидать, что способы лечения классических экзогенных ретровирусов приведут к полному контролю патогенной экспрессии HERV и, следовательно, что они обладают оптимальной терапевтической эффективностью, при наличии таковой, в отношении HERV-ассоциированных заболеваний.

Существует, таким образом, неудовлетворенная в течение длительного периода времени потребность в новой антиретровирусной терапевтической стратегии, ориентированной на вирусы HERV.

Сущность изобретения

Первый аспект настоящего изобретения предусматривает комбинацию для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с HERV-W, которая включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против белка оболочки HERV-W (HERV-W Env), содержащие три CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, и три CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и лекарственное средство - ингибитор ретровирусной обратной транскриптазы.

Согласно изобретению указанное лекарственное средство представляет собой азидотимидин (AZT).

Согласно изобретению указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, диатела и мультиспецифичных антител.

Согласно изобретению указанное антитело представляет собой моноклональное гуманизированное антитело.

Согласно изобретению указанное антитело включает

тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и

легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

Второй аспект настоящего изобретения предусматривает применение предложенной комбинации для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с HERV-W.

Согласно изобретению указанное заболевание, ассоциированное с HERV-W, выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS), шизофрении (SZ), биполярного расстройства (BP), однополярной или психотической депрессии, клинически изолированного синдрома (CIS, с неврологическим симптомом), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIPD), эпилепсии, псориаза, рака, воспалительного панкреатита и диабета, такого как сахарный диабет 1- или 2-го типа.

Согласно изобретению указанное заболевание, ассоциированное с HERV-W, выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS) и хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIPD).

Третий аспект настоящего изобретения предусматривает способ предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с HERV-W, включающий введение предложенной комбинации.

Подробное описание изобретения

Определения

Используемые в настоящем описании термины "человеческий эндогенный ретровирус" и "HERV" относятся к эндогенным ретровирусам человека, которые содержат вирус, принадлежащий к семейству эндогенных ретровирусов W-типа, как правило, под названием "HERV-W".

"HERV-W" представляет собой семейство эндогенных ретровирусов человека, которое открыто в геноме человека после первоначального открытия "ретровируса, ассоциированного с множественным склерозом", MSRV, ретровирусом человека, впервые выделенным из пациентов с рассеянным склерозом. Поэтому, когда исследования упоминают "LM7" (первый изолят, описанный для MS) "MS-ретровирус", "MSRV", "Синцитин", "HERV-W 7Q", "ERVW-E1", "ERVW-E2", "копии HERV-W с X-хромосомы" или "HERV-W", то они все обозначают элементы HERV-W.

Используемый в данном описании термин "MSRV" относится к определенному эндогенному ретровирусу, который является представителем семейства HERV-W. В контексте настоящего изобретения оба термина "HERV-W" и "MSRV" обозначают элементы HERV-W. В частности, выражения "HERV-W Env" и "MSRV-ENV", оба, относятся к одним и тем же оболочечным белкам. Как правило, возможные немногие вариации в аминокислотной последовательности не предотвращают связывание специфических анти-ENV антител для терапевтического применения, в частности антитела, содержащего тяжелую цепь (HC) с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь (LC) с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 10.

Используемое в данном описании выражение "HERV-W-ассоциированное заболевание" относится к патологическому состоянию, связанному с экспрессией HERV-W, предпочтительно белка оболочки HERV-W. Как правило, указанное HERV-W-ассоциированное заболевание представляет собой хроническое воспалительное заболевание. Используемый в данном описании термин "хроническое воспалительное заболевание" относится к любому заболеванию, в котором сохраняющееся или рецидивирующее воспаление управляется врожденным иммунитетом и/или адаптивным иммунитетом, участвующим в повреждении тканей, и/или может быть обнаружено локально или системно из-за избыточной экспрессии провоспалительных молекул.

Предпочтительно, если указанное HERV-W-ассоциированное заболевание выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS), шизофрении (SZ), биполярного расстройства (BP), однополярной или психотической депрессии, клинически изолированного синдрома (CIS, с неврологическим симптомом), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIPD), эпилепсии, псориаза, рака, воспалительного панкреатита и сахарного диабета, такого как сахарный диабет 1-го или 2-го типа. Более предпочтительно, если HERV-W-ассоциированное заболевание выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS) и хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIPD), которые оба являются демиелинизирующими заболеваниями.

Используемый в данном описании термин "осуществлять лечение" или "лечение", используемый в данном документе, означает обращение, облегчение, подавление развития или предотвращение расстройства или состояния, к которому этот термин применяется, или обращение, облегчение, подавление развития, или предотвращение одного или нескольких симптомов заболевания или состояния, к которому этот термин применяется.

Используемый в данном описании термин "предотвращение" означает предотвращение заболевания или состояния у объекта, который еще не демонстрировал клинические симптомы, типичные поражения или физиологические дисфункции, которые позволили бы осуществить ее клинический диагноз.

Используемые в данном документе термины "антитело" или "иммуноглобулин" имеют одно и то же значение и будут использоваться в равной степени в настоящем изобретении. Термин "антитело", используемый в данном описании, относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов, т.е. к молекулам, которые содержат сайт связывания антигена, который специфически связывается с антигеном. Таким образом, термин "антитело" включает не только целые молекулы антител, но и фрагменты антител, а также производные антител.

Используемый в данном описании термин "фрагмент антитела" относится к такой части антитела, которая имитирует гипервариабельную область, такую как CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3). Фрагменты антитела по настоящему изобретению сохраняют аффинность связыва-

ния и специфичность указанного антитела. Такие фрагменты являются функциональными эквивалентами указанного антитела, и они связываются, по существу, с тем же эпитопом, что и указанное антитело. Примеры фрагментов антитела включают, без ограничения перечисленным, тяжелую цепь, легкую цепь, VL, VH, Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂.

Используемый в данном описании термин "производное антитела" относится к фрагменту антитела по изобретению, предпочтительно включающему по меньшей мере один CDR из указанного антитела, предпочтительно по меньшей мере один CDR3 указанного антитела, слитый по меньшей мере с одной последовательностью, отличной от естественной последовательности (например, последовательности линкера из другого вида, ...), причем производное имеет аффинность связывания и специфичность по отношению к E_hv HERV-W, сравнимые с антителом по настоящему изобретению. Производные по настоящему изобретению сохраняют аффинность связывания и специфичность указанного антитела. Такие производные функциональные эквиваленты указанного антитела, и они связываются, по существу, с тем же эпитопом, что и указанное антитело. Примеры производных антител включают, без ограничения перечисленным, ScFv (ScFv)₂ и диатела.

В естественных антителах две тяжелые цепи (HC) связаны друг с другом дисульфидными связями и каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью (LC) дисульфидной связью. Есть два типа легкой цепи: лямбда (λ) и каппа (κ). Есть пять основных классов тяжелой цепи (или изотипов), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит различные последовательности доменов.

Как правило, легкая цепь включает два домена, переменный домен (VL) и константный домен (CL). Тяжелая цепь включает четыре домена, переменный домен (VH) и три константные области (CH1, CH2 и CH3, имеющие общее название CH). Переменные области как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепей определяют сайт связывания, специфичный для антигенного эпитопа. Константная область доменов легкой (CL) и тяжелой (CH) цепей придает важные биологические свойства, такие как ассоциация цепей антитела, секреция, трансплацентарная мобильность, комплементарное связывание и связывание с рецепторами Fc (FcR). Фрагмент Fv является N-концевой частью фрагмента Fab иммуноглобулина и состоит из переменных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антител заключается в структурной комплементарности между сайтом связывания антитела и антигенным эпитопом. Сайты связывания антител состоят из остатков, которые в основном происходят из гиперпеременной или определяющей комплементарности области (CDR). Несистематически остатки из негиперпеременной или каркасной областей (FR) влияют на общую структуру домена и, следовательно, сайт связывания. Гиперпеременные области или CDR относятся к аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют сродство связывания и специфичность природной Fv-области сайта связывания нативного иммуноглобулина. Легкие и тяжелые цепи иммуноглобулина, каждая, имеют по три CDR, обозначенные как L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 и H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 соответственно. Антигенсвязывающий участок, следовательно, включает шесть CDR, состоящих из набора CDR от каждой из тяжелой и легкой цепей V-области. Каркасные области (FR) относятся к аминокислотным последовательностям, расположенным между CDR.

Используемый в данном описании термин "гибридное антитело" означает антитело, которое содержит VH-домен и VL-домен антитела из любого вида, предпочтительно мыши, и CH-домен и CL-домен человеческого антитела.

В соответствии с изобретением термин "гуманизованное антитело" означает антитело, имеющее каркасную область переменного участка и константные области из человеческого антитела при сохранении CDR антитела из любого вида, предпочтительно мыши.

Термин "Fab" означает фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу около 50000 и активность связывания антигена, в котором около половины N-концевой части H-цепи и вся L-цепь, среди фрагментов, полученных обработкой IgG протеазой, папаином, связаны друг с другом через дисульфидную связь.

Используемый в данном описании термин "F(ab')₂" относится к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу около 100000 и активность связывания антигена, который немного больше, чем Fab, связанный через дисульфидную связь шарнирной области, среди фрагментов, полученных обработкой IgG с помощью протеазы, пепсина.

Используемый в данном описании термин "Fab'" относится к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу около 50000 и активность связывания антигена, который получен путем разрезания дисульфидной связи в шарнирной области F(ab')₂.

Выражения "одноцепочечный Fv" или "ScFv" относятся к полипептиду, который является ковалентно связанным VH::VL гетеродимером, и обычно экспрессируется из слияния генов, включая гены, кодирующие VH и VL, связанные пептид-кодируемым линкером. "dsFv" является VH::VL гетеродимером, стабилизированным дисульфидной связью. Двухвалентные и поливалентные фрагменты антител могут образовываться либо спонтанно, путем объединения одновалентных scFv либо могут быть получены путем соединения одновалентных scFv пептидным линкером, такие как двухвалентные sc(Fv)₂.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, где фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL). При использовании линкера, который является слишком коротким для того, чтобы позволить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта.

Используемый в данном описании термин "антитело по изобретению" относится к антителу, направленному против, т.е. которое специфически связывается с, белка оболочки HERV-W (Env HERV-W), предпочтительно против белка оболочки HERV-W W-типа семейства эндогенных ретровирусов человека (HERV-W), а более предпочтительно против белка оболочки MSRВ, более предпочтительно против внеклеточного домена белка оболочки MSRВ. Предпочтительно, если антитело по настоящему изобретению включает все шесть CDR, представленных в SEQ ID NO: 1-6.

Используемый в настоящем описании термин "биологический образец" относится к любому биологическому образцу, полученному с целью оценки *in vitro*. В настоящем изобретении образец или образец из пациента может содержать любую биологическую жидкость или болезнь-специфичную ткань или поражение. Примеры биологической жидкости включают кровь, сыворотку, плазму, аспират сосков, мочу, слюну, синовиальную жидкость и спинномозговую жидкость (CSF). Примеры болезнь-специфичной ткани и поражения включают бляшки мозга при MS, нервные биопсии при СІDР или биопсии поджелудочной железы при диабете.

Антитело для применения в качестве антиретровирусного лекарственного средства.

Патогенная экспрессия HERV-W происходит у некоторых людей с патологическими состояниями, в частности, при экспрессии элементов вируса, ассоциированного с рассеянным склерозом (MSRV) семейства HERV-W. Было показано вовлечение белка оболочки в качестве единственного патогенного игрока среди HERV-W-кодируемых белков при экспонировании иммунной системы или нейроглиальным клеткам, несмотря на наличие у пациентов *gag*-кодируемых антигенов HERV-W.

На сегодняшний день терапевтическая стратегия заключается в направленном воздействии на белок оболочки HERV-W с нейтрализующим гуманизированным антителом, для того, чтобы предотвратить и ингибировать его иммуновоспалительные и нейропатогенные эффекты при HERV-W-ассоциированных заболеваниях человека. Следовательно, этот терапевтический подход направлен вверх по воспалительному каскаду и целевым цитотоксическим эффектам, в частности вверх по воспалительному демиелинизирующему каскаду с блокадой ремиелинизации при возникновении поражений с ослабленным лечебным потенциалом в центральной нервной системе (ЦНС) при MS.

Авторы оценивали гуманизированное антитело IgG4, которое селективно связывается с внеклеточным доменом белка оболочки MSRВ, называемое в данном документе "GNbAC1", на предмет его безопасности и фармакокинетику у здоровых добровольцев в фазе I клинических испытаний. Это антитело также оценивали у пациентов с MS в течение одного года, при повторных инфузиях антитела GNbAC1 через каждые 4 недели при 6 или 2 мг/кг в двух параллельных когортах. В поздней фазе IIa клинических испытаний у пациентов с MS авторы настоящего изобретения получали образцы крови от пациентов до и во время исследования, в котором биомаркеры HERV-W тестировали в первый раз после 6 месяцев лечения с помощью количественной ОТ-ПЦР (qRT-PCR) для того, чтобы изучить специфическую экспрессию мРНК *env* и *pol* из HERV-W при обработке GNbAC1.

Результаты, полученные таким образом, показали совершенно неожиданное и неизвестное влияние антитела GNbAC1 на нейтрализацию белка Env HERV-W *in vivo*.

Действительно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что люди-пациенты, получавшие лечение этим антителом, продемонстрировали ингибирующий эффект на саму экспрессию ретровирусного генома HERV-W, который не ограничивается геном *env*, экспрессирующим белок оболочки, используемого в качестве специфической мишени для GNbAC1. Действительно, результаты авторов неоспоримо показывают, что уровни как мРНК *env* (кодирующий белок оболочки HERV-W), так и мРНК *pol* (кодирующий ферменты HERV-W, в том числе обратную транскриптазу) показали параллельное и постепенное уменьшение через три и шесть месяцев лечения по сравнению с уровнями, измеренными до начала лечения у тех же пациентов.

Таким образом, значительный антиретровирусный эффект на экспрессию HERV-W наблюдается через 6 месяцев лечения с помощью GNbAC1 и влияет параллельно как на экспрессию как гена *env*, так и гена *pol*. Поскольку не ожидалось, что экспрессия ретровирусной РНК HERV-W будет регулировать экспрессию белка оболочки HERV-W, а уж тем более мРНК гена *pol*, который кодирует полностью несвязанные антигенные белки, авторы пришли к выводу, что неизвестный эффект на Env HERV-W (или MSRВ-ENV) оказывает положительно влияние на генетическую регуляцию HERV-W, связанную с его болезнь-ассоциированной экспрессией, как показано у больных с рассеянным склерозом, а также антагонизируется с помощью GNbAC1 у пациентов фазы IIa клинических испытаний, проведенных авторами изобретения (см. пример 1). Этот эффект вообще не связан с известными патофизиологическими эффектами Env HERV-W на иммунную и нейроглиальную системы.

Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, его фрагменту или его производному для применения в качестве антиретровирусного лекарственного средства, направленного на вирус, принадлежащий к эндогенным ретровирусам человека (HERV), где указанное антитело, фрагмент или производное направлены против белка оболочки HERV-W (Env HERV-W).

Используемый в данном описании термин "антиретровирусное лекарственное средство, направленное на вирус, принадлежащий к эндогенным ретровирусам человека (HERV)", относится к антителу, его фрагменту или его производному, способному ингибировать экспрессию и/или репликацию вируса, принадлежащего к эндогенным ретровирусам человека (HERV). Более конкретно, указанная экспрессия относится к антителу, способному

супрессировать или ингибировать полностью или частично репликацию вируса, принадлежащего к HERV, предпочтительно принадлежащего к семейству HERV-W. Как правило, указанные супрессия или ингибирование репликации являются глобальными и полными; или

супрессировать или ингибировать полностью или частично экспрессию вируса, принадлежащего к эндогенным ретровирусам человека (HERV), предпочтительно представляющего собой вирус, принадлежащий к эндогенным ретровирусам человека W-типа (HERV-W), или экспрессию белка оболочки указанного вируса.

Предпочтительно, если указанный вирус относится к семейству эндогенных ретровирусов человека W-типа (HERV-W). Более предпочтительно, если указанный вирус является MSRV. В этом конкретном воплощении изобретения антитело согласно изобретению направлено против белка оболочки MSRV.

В предпочтительном воплощении антиретровирусное лекарственное средство в соответствии с изобретением супрессирует или ингибирует полностью или частично экспрессию env- и/или pol - кодируемых белков вируса, принадлежащего к HERV, предпочтительно вируса, принадлежащего к HERV-W.

Авторы настоящего изобретения показали, что нацеливание на конкретный белок оболочки из MSRV приводит к удивительному эффекту ингибирования или супрессирования экспрессии вируса. Как упоминалось ранее, MSRV участвует в возникновении и развитии некоторых заболеваний. Следовательно, антитело по изобретению является весьма перспективным для применения при лечении HERV-W-ассоциированного заболевания, предпочтительно патологии, связанной с экспрессией белка оболочки HERV-W (Env HERV-W).

Предпочтительно, если указанное HERV-W-ассоциированное заболевание выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS), шизофрении (SZ), биполярного расстройства (BP), однополярной или психотической депрессии, клинически изолированного синдрома (CIS, с неврологическим симптомом), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), эпилепсии, псориаза, рака, воспалительного панкреатита и сахарного диабета, такого как сахарный диабет 1- или 2-го типа.

Более предпочтительно HERV-W-ассоциированное заболевание выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS) и хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP).

В одном воплощении настоящее изобретение также относится, в качестве агента для применения при профилактике и/или лечении заболевания, выбранного из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS), шизофрении (SZ), биполярного расстройства (BP), однополярной или психотической депрессии, клинически изолированного синдрома (CIS, с неврологическим симптомом), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), эпилепсии, псориаза, рака, воспалительного панкреатита и диабета, такого как сахарный диабет 1- или 2-го типа, где указанное средство состоит из антитела, направленного против белка оболочки HERV-W (Env HERV-W), или его фрагмента, или его производного. В этом конкретном воплощении антитело препятствует экспрессии HERV-W.

В одном из воплощений изобретения антитело, фрагмент или производное по настоящему изобретению включает каждый из шести CDR, представленных в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

В одном из воплощений изобретения антитело, фрагмент или производное по настоящему изобретению включают

легкую цепь, в которой переменный домен содержит каждый из трех CDR, представленных в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, SEQ ID NO: 2 для CDR-L2 и SEQ ID NO: 3 для CDR-L3; и

тяжелую цепь, в которой переменный домен содержит каждый из трех CDR, представленных в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 для CDR-H3.

Вышеуказанные гиперпеременные участки (CDR), представлены в табл. 1.

Таблица 1

CDR-домены антитела по изобретению

Домены	SEQ ID NO:	Последовательность
CDR-L1	1	Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
CDR-L2	2	Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
CDR-L3	3	Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Leu Thr
CDR-H1	4	Asp Tyr Glu Met His
CDR-H2	5	Ala Val Ala Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Gly Lys
CDR-H3	6	Thr Val Val Pro Phe Ala Tyr

В одном из воплощений изобретения антитело, фрагмент или производное по настоящему изобретению включают

вариабельную область легкой цепи (VL), представленную в SEQ ID NO: 7; и

вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную в SEQ ID NO: 8.

Вышеупомянутые легкие и тяжелые вариабельные области описаны в табл. 2.

Таблица 2

Легкие и тяжелые вариабельные области антитела по изобретению

Домены	SEQ ID NO:	Последовательность
VL	7	Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Trp Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
VH	8	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Val Ala Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Thr Val Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

В одном из воплощений изобретения антитело, фрагмент или производное по изобретению выбраны из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, ScFv, SC(Fv)₂, диатела и мультиспецифического антитела, образованных из фрагментов антител.

В предпочтительном воплощении изобретения антитело согласно изобретению представляет собой моноклональное антитело. Моноклональные антитела по изобретению являются одновалентными, двухвалентными, мультивалентными, моноспецифичными, биспецифичными или мультиспецифичными. В другом воплощении изобретения антитело, направленное против Env HERV-W, представляет собой связывающий фрагмент или конъюгат. Примерные антитела по изобретению могут быть конъюгированы с ростингибирующим агентом, цитотоксическим агентом или активирующим пролекарство ферментом.

Также может быть желательно модифицировать антитело по изобретению в отношении эффекторной функции, например, для того, чтобы усилить антигензависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC) антитела. Это может быть достигнуто путем введения одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-область антитела. Альтернативно или дополнительно, остаток(ки) цистеина может быть введен в Fc-область, таким образом делая возможным образование межцепных дисульфидных связей в этой области. Таким образом, гомодимерное антитело может иметь улучшенную способность к интернализации и/или повышенный комплемент-опосредованный лизис клеток и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) (Caron P.C. et al. 1992; and Shopes B. 1992).

Другой тип модификации аминокислот антитела по изобретению может быть полезен для изменения исходного паттерна гликозилирования антитела. Под термином "изменение" подразумевается удаление одного или нескольких углеводных остатков в антителе и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые отсутствуют в антителе. Гликозилирование антител, как правило, является N-связанным. "N-связанный" относится к присоединению углеводного остатка к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X обозначает любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. Добавление сайтов гликозилирования к антителу удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что она содержит один

или несколько из описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования).

В другом воплощении антитело по изобретению представляет собой моноклональное гуманизованное антитело, более предпочтительно представляет собой IgG4-гуманизованное моноклональное антитело.

Указанное гуманизованное антитело может быть создано путем получения последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих домен CDR, путем вставки их в экспрессирующий вектор для животной клетки, имеющий гены, кодирующие константную область тяжелой цепи, идентичную тяжелой цепи человеческого антитела; и константную область легкой цепи, идентичную легкой цепи человеческого антитела, и экспрессии экспрессирующего вектора путем введения его в клетку животного. Экспрессирующий вектор гуманизованного антитела может быть либо типа, в котором ген, кодирующий тяжелую цепь антитела, и ген, кодирующий легкую цепь антитела, находятся на отдельных векторах, либо типа, в котором оба гена находятся на одном и том же векторе (тандемного типа). В отношении легкости конструирования экспрессирующего вектора с гуманизованным антителом, легкости введения в животные клетки и баланса между уровнями экспрессии H- и L-цепей антитела в клетках животных тандемный тип экспрессирующего вектора с гуманизованным антителом является более предпочтительным. Примеры экспрессирующего вектора тандемного типа с гуманизованным антителом включают pKANTEH93, pEE18 и т.п. Способы получения гуманизованных антител, основанные на использовании традиционных методов рекомбинантной ДНК и трансфекции генов, хорошо известны в данной области. Антитела могут быть гуманизованы с использованием различных методов, известных в данной области, включая, например, прививку CDR, венирование или изменение поверхности и перетасовку цепи. Общая технология рекомбинантной ДНК для получения таких антител также известна.

Таким образом, воплощение настоящего изобретения относится к моноклональному гуманизованному антителу, содержащему

легкую цепь, в которой переменный домен содержит каждый из трех CDR, которые отображены в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, SEQ ID NO: 2 для CDR-L2 и SEQ ID NO: 3 для CDR-L3; и

тяжелую цепь, в которой переменный домен содержит каждый из трех CDR, которые отображены в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 для CDR-H3.

В конкретном воплощении тяжелая цепь (HC) указанного гуманизованного антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, а легкая цепь (LC) указанного антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. Это специфическое антитело называется в данном документе "GNbAC1".

Вышеупомянутые тяжелые и легкие цепи описаны в табл. 3.

НС и LC гуманизированного антитела

Домены	SEQ ID NO:	Последовательность
НС	SEQ ID No: 9	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Val Ala Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Thr Val Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Lys Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala LeuHis Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
LC	SEQ ID No: 10	Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Trp Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

Композиция для применения в качестве антиретровирусного лекарственного средства.

Авторы изобретения дополнительно исследовали недавно выявленный антиретровирусный эффект антитела по изобретению. С этой целью они оценивали его влияние *in vitro* на клеточные культуры, экспрессирующие gag, pol и env-кодируемые белки, которые детектировались специфичными антителами в анализе вестер-блоттинг.

Авторы настоящего изобретения подтвердили, что экспрессия белка pol, соответствующего обратной транскриптазе (RT) из HERV-W, оказалась менее важной в клетках, культивируемых в присутствии GNBAC1, в дополнение к снижению уровней pol-РНК у пациентов, получавших GNBAC1. Кроме того, как известно, RT амплифицирует ретровирусную экспрессию путем создания дополнительных копий ДНК ретровирусов из экспрессированных РНК. Эти вновь полученные ретровирусные ДНК-копии могут затем экспрессировать соответствующую РНК, тем самым усиливая глобальную экспрессию ретровирусного элемента путем умножения экспрессирующих копий через продукт самой этой экспрессии, такой как RT из pol РНК.

Вследствие этого у них появилась идея о том, что сочетание GNBAC1 и ингибитора ретровирусной обратной транскриптазы, такого как азидотимидин (AZT), может оказывать более сильные ингибирующие воздействия на экспрессию HERV-W, в частности на экспрессию RT, представленную в качестве примера в настоящем случае.

Были проведены дополнительные исследования, и, что удивительно, эта комбинация антитела, направленного против Env HERV-W, и лекарственного средства, ингибирующего ретровирусную обратную транскриптазу, отменила экспрессию белка RT HERV-W в этих продуцирующих клетках.

В параллельных и одновременных культурах положительная детекция RT HERV-W с помощью вестерн-блоттинга в необработанных клетках и незначительное или частичное снижение в клетках, обработанных только GNBAC1 или AZT, подтвердили специфичность и значимость этого наблюдения: в тех же условиях сочетание антитела GNBAC1, нейтрализующего белок Env HERV-W, и AZT отменило детек-

цию данного белка RT HERV-W.

Таким образом, во втором аспекте, настоящее изобретение относится к композиции, включающей антитело, фрагмент или производное в соответствии с настоящим изобретением и лекарственное средство, ингибирующее ретровирусную обратную транскриптазу, для применения в качестве антиретровирусного лекарственного средства, нацеленного на вирус, принадлежащий к эндогенным ретровирусам человека (HERV).

Предпочтительно, если указанное лекарственное средство, ингибирующее ретровирусную обратную транскриптазу, выбрано из группы, состоящей из азидотимидина, энтекавира, ламивудина, адефовира, софосбувира, диданозина, тенофовира, абакавира, ламивудина, ставудина, эмтрицитабина, зальцитабина, тельбивудина и диданозина. Более предпочтительно, если указанное лекарственное средство, ингибирующее ретровирусную обратную транскриптазу, представляет собой азидотимидин (AZT). Все ранее описанные технические данные применимы в данном документе.

Композиция по изобретению обеспечивает неожиданную и новую перспективу для терапевтического вмешательства при патогенной экспрессии HERV-W. Обработка с помощью комбинации:

антитело, направленное против Env HERV-W, такое как GNbAC1; и

молекула, нацеленная на самую обратную транскриптазу и/или на ее активность, такая как AZT, оказалась весьма полезной при ингибировании экспрессии RT из HERV-W при заболеваниях, связанных с HERV-W.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к композиции, включающей антитело, фрагмент или производное в соответствии с настоящим изобретением и лекарственное средство, ингибирующее ретровирусную обратную транскриптазу, для применения при профилактике и/или лечении HERV-W-ассоциированного заболевания.

Изобретение также относится к композиции, включающей антитело, фрагмент или производное в соответствии с настоящим изобретением и лекарственное средство, ингибирующее ретровирусную обратную транскриптазу, для применения при профилактике и/или лечении заболевания, выбранного из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS), шизофрении (SZ), биполярного расстройства (BP), однополярной или психотической депрессии, клинически изолированного синдрома (CIS, с неврологическим симптомом), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), эпилепсии, псориаза, рака, воспалительного панкреатита и сахарного диабета, такого как сахарный диабет 1- или 2-го типа. Более предпочтительно, если указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS) и хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии (CIDP).

Все ранее описанные технические данные применимы в данном документе.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к антителу, направленному против белка оболочки HERV-W (Env HERV-W), или его фрагменту, или его производному и лекарственному средству, ингибирующему ретровирусную обратную транскриптазу, предпочтительно азидотимидину, в качестве комбинированного состава для одновременного, раздельного или последовательного применения в способе лечения HERV-W-ассоциированного заболевания, предпочтительно заболевания, выбранного из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS), шизофрении (SZ), биполярного расстройства (BP), однополярной или психотической депрессии, клинически изолированного синдрома (CIS, с неврологическим симптомом), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), эпилепсии, псориаза, рака, воспалительного панкреатита и сахарного диабета, такого как сахарный диабет 1- или 2-го типа.

Все ранее описанные технические данные применимы в данном документе.

Набор по изобретению.

Экспрессия элементов HERV-W у пациентов с заболеванием и/или их детекция в болезнь-специфичной ткани и поражениях выявляет и определяет общую категорию HERV-W-ассоциированных заболеваний или синдромов. Это также отражает биологическую активность HERV-W в ходе эволюции заболевания и во время его лечения.

Таким образом, детекция HERV-W с улучшенной чувствительностью, с исключительной специфичностью заболевания или с конкретной ассоциацией с клиническими признаками у больных с HERV-W-ассоциированными заболеваниями или синдромами имеет важное значение для диагностической идентификации и стратификации, а также для последующих мер и терапевтического мониторинга пациентов. Из панели праймеров, зондов и ПЦР-протоколов авторы настоящего изобретения, таким образом, выбрали и разработали набор праймеров и зондов, который показал себя полезным для детекции присутствия и/или измерения уровня экспрессии HERV у пациентов.

Следовательно, в четвертом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, предпочтительно по меньшей мере четыре, предпочтительно по меньшей мере пять, предпочтительно по меньшей мере шесть, предпочтительно по меньшей мере семь, предпочтительно по меньшей мере восемь, предпочтительно по меньшей мере девять, предпочтительно по меньшей мере десять олигонуклеотидов, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-28.

В предпочтительном варианте указанный набор содержит, по меньшей мере, последовательность SEQ ID NO: 17 и/или 18 или SEQ ID NO: 19 и 20.

В ином случае указанный набор включает

SEQ ID NO: 19, 20, 23, 24 и 25; или

SEQ ID NO: 17, 18, 23, 24 и 25; или

SEQ ID NO: 19, 20, 14, 15, 16, 23, 24 и 25; или

SEQ ID NO: 17, 18, 14, 15, 16, 23, 24 и 25.

Более предпочтительно набор по изобретению включает все олигонуклеотиды, представленные в SEQ ID NO: 11-28. Как правило, указанный набор предназначен для применения в ПЦР или, более конкретно, в анализе количественной ПЦР (кПЦР). Таким образом, набор предпочтительно содержит также праймеры и/или зонды из эталонных клеточных генов, наиболее подходящих для относительной количественной оценки РНК или ДНК и для различных состояний.

Указанный набор предпочтительно дополнительно включает

SEQ ID NO: 26, 27 и 28; или

последовательности, специфичные для гена GUSB; или

последовательности, специфичные для гена РНазы Р; или

последовательности, специфичные для эталонного клеточного гена для относительной количественной оценки кПЦР.

Указанный набор полезен для отслеживания при детекции и/или количественной оценки вируса, относящегося к семейству человеческих эндогенных ретровирусов W-типа (HERV-W), включающему MSRV, но также и другие подтипы HERV-W. Более конкретно, набор по изобретению полезен для обнаружения и/или количественной оценки последовательностей, кодирующих Env HERV-W, а также последовательностей, кодирующих полипротеин pol HERV-W, в том числе RT. Как правило, детекция и/или количественная оценка HERV-W у пациента включает:

(i) детекцию и/или количественную оценку специфических для HERV-W РНК, ДНК или антигенов, предпочтительно детектируемых в биологических жидкостях или в болезнь-специфических тканях и поражениях;

(ii) обнаружение и/или количественную оценку повышенного уровня числа копий ДНК или РНК в клетках или тканях из крови или из органов с поражением или дисфункцией.

Следовательно, в пятом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, его фрагменту или производному, направленному против белка оболочки HERV-W (Env HERV-W), для применения в качестве антиретровирусного лекарственного средства, направленного на вирус, принадлежащий HERV, предпочтительно HERV-W, более предпочтительно к MSRV, у пациента, страдающего от HERV-W-ассоциированного заболевания, где указанный пациент идентифицируется по способу, включающему стадию i) детекции и/или количественной оценки HERV-W в биологическом образце.

В этом конкретном воплощении врач будет, таким образом, в состоянии адаптировать и оптимизировать соответствующую медицинскую помощь пациенту, страдающему от HERV-W-ассоциированного заболевания. Мониторинг наличия и/или уровня экспрессии HERV-W чрезвычайно подходит для последующего наблюдения и принятия клинических решений. В самом деле, врач для каждого пациента может определить соответствующую терапию с помощью оптимальной стратегии.

Как правило, стадия i) детекции и/или количественной оценки может быть выполнена в соответствии с обычными методами, хорошо известными специалисту в данной области. Как правило, указанная стадия i) включает контакт биологического образца пациента с селективными реагентами, такими как зонды, праймеры, лиганды или антитела, и, таким образом, детекцию присутствия изначально представляющих интерес нуклеиновых кислот или белков в образце. Предпочтительно указанная стадия i) детекции присутствия и/или количественной оценки HERV-W осуществляется с помощью набора в соответствии с изобретением.

Все упомянутые выше технические данные применимы в данном документе.

Фармацевтическая композиция.

Еще одна задача настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективную дозу антитела, направленного против белка оболочки HERV-W (Env HERV-W), и необязательно содержащей лекарственное средство, ингибирующее ретровирусную обратную транскриптазу.

Любое лекарственное средство по изобретению, как описано выше, может быть объединено с фармацевтически приемлемыми наполнителями и, необязательно, матрицей с замедленным высвобождением, такой как биоразлагаемые полимеры, для формирования терапевтических композиций.

"Фармацевтически" или "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным сущностям и композициям, которые не вызывают неблагоприятные, аллергические или другие нежелательные реакции при введении млекопитающему, особенно человеку, в зависимости от обстоятельств. Фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или композиции вспомогательного средства любого типа.

Форма фармацевтических композиций, способ введения, дозировка и режим, естественно, зависят от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, массы и пола пациента и т.д.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены для местного, перорального, интраназального, внутриглазного, внутривенного, внутримышечного или подкожного введения и т.п.

Предпочтительно фармацевтические композиции содержат транспортные средства, которые являются фармацевтически приемлемыми для состава, приспособленного для инъекции. Они могут быть, в частности, изотоническими, стерильными, солевыми растворами (мононатриевым или динатриевым фосфатом, натрия, калия, кальция или магния хлорид и т.п., или смеси таких солей) или сухой, особенно лиофилизированной композицией, которая при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического солевого раствора позволяет образовывать растворы для инъекций.

Дозы, используемые для введения, могут быть адаптированы в зависимости от различных параметров, в частности в зависимости от используемого способа введения, соответствующей патологии или в ином случае от исковой продолжительности лечения.

Для приготовления фармацевтических композиций эффективное количество антитела, направленного против белка оболочки HERV-W (Env HERV-W), может быть растворено или диспергировано в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии; составы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы легко забираться шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Растворы активных соединений в виде свободного основания или его фармакологически приемлемой соли могут быть получены в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии могут быть также получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, их смесях и в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти препараты могут содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

После приготовления растворы будут вводиться способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в различных лекарственных формах, таких как инъекционные растворы, описанные выше, но также могут быть использованы капсулы для высвобождения лекарственного средства и т.п.

Предпочтительно антитело или его фрагмент и производное, направленное против белка оболочки HERV-W (Env HERV-W) по настоящему изобретению, может быть приготовлено в буфере, в котором оно сольбуилизуется, хранится и инъецируется пациентом. Предпочтительно, если указанный буфер содержит 20 мМ гистидина, 5% сахарозы и 0,01% полисорбата 20 и имеет pH 6,0. Один пример композиции, используемой для внутривенного введения GNbAC1, представлен в примере 3.

Для парентерального введения, например в водном растворе, раствор может быть подходящим образом помещен в буфер, а жидкий разбавитель сначала делают изотоническим с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно пригодны для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим стерильные водные среды, которые могут быть использованы, будут известны специалистам в данной области в свете настоящего описания. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлена к 1000 мл жидкости подкожной клетчатки, либо инъецирована в предлагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15-е изд., с. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторые вариации в дозировке обязательно будут иметь место в зависимости от состояния пациента, подлежащего лечению. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять соответствующую дозу для конкретного пациента.

В дополнение к соединениям для парентерального введения, например внутривенной или внутримышечной инъекции, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые вещества для перорального введения; капсулы, высвобождающие с задержкой времени; и любые другие формы, используемые в настоящее время.

Терапевтический способ и мониторинг в соответствии с изобретением.

Изобретение также относится к способу ингибирования экспрессии и/или репликации вируса, принадлежащего к эндогенным ретровирусам человека (HERV), у пациента путем введения указанному пациенту антитела, направленного против белка оболочки HERV-W (Env HERV-W).

В еще одном воплощении настоящее изобретение относится к способу профилактики и/или лечения пациента, страдающего заболеванием, выбранным из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS), шизофрении (SZ), биполярного расстройства (BP), однополярного или психотической депрессии, клинически изолированный синдром (CIS, с неврологическим симптомом), хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии (CIPD), эпилепсии, псориаза, рака, воспалительного панкреатита и сахарного диабета, такого как сахарный диабет 1- или 2-го типа, путем введения указанному пациенту

антитела, его фрагмента или производного, нацеленного против белка оболочки HERV-W (Env HERV-W), где указанное антитело действует как антиретровирусное лекарственное средство, нацеленное на HERV, предпочтительно нацеленное на HERV-W, более предпочтительно нацеленное на MSR.V.

Изобретение также относится к способу лечения пациента, страдающего от HERV-W-ассоциированного заболевания, включающему стадии:

1) прогнозирование у пациента путем детекции и/или количественной оценки вируса, принадлежащего к семейству эндогенных ретровирусов человека (HERV), предпочтительно HERV-W, более предпочтительно к MSR.V, в биологическом образце с помощью набора по настоящему изобретению; и затем

2) если указанная стадия 1) показывает экспрессию человеческого эндогенного ретровируса (HERV), то способ по настоящему изобретению включает стадию

3) обеспечение пациента антителом, фрагментом или производным по изобретению.

Изобретение также относится к способу мониторинга ответа на лечение пациента, страдающего от HERV-W-ассоциированного заболевания, причем указанный способ включает следующие стадии:

a) лечение указанного пациента антителом, фрагментом или производным в соответствии с изобретением; затем

b) детекция и/или количественная оценка HERV-W в биологическом образце из указанного пациента.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к способу мониторинга ответа на лечение пациента, страдающего от HERV-W-ассоциированного заболевания, причем указанный способ включает стадию детекции и/или количественной оценки HERV-W в биологическом образце из указанного пациента. Предпочтительно, если указанный пациент содержит антитело, фрагмент или производное в соответствии с настоящим изобретением. Выражение "пациент, содержащий антитело" относится к пациенту, который был обработан антителом, и демонстрирует детектируемое количество указанного антитела в крови, тканях или органах. Как правило, указанное антитело, фрагмент или производное предоставляют или вводят пациенту перед стадией детекции и/или количественной оценки HERV-W.

В соответствии с изобретением в случае мониторинга ответа на лечение пациента, страдающего от HERV-W-ассоциированного заболевания, биологический образец может представлять собой образец биологической жидкости, такой как кровь, спинномозговая жидкость, моча или в болезнь-специфичную ткань и поражения, такие как бляшки мозга при MS, нервные биопсии при CIDP или биопсии поджелудочной железы при диабете.

Как правило, стадия (b) детекции и/или количественной оценки может быть проведена в соответствии с обычными технологическими методами, хорошо известными специалисту в данной области. Как правило, указанная стадия (b) включает приведение в контакт биологического образца пациента с селективными реагентами, такими как зонды, праймеры, лиганды или антитела, и, таким образом, обнаружение изначального присутствия представляющих интерес нуклеиновых кислот или белков в образце. Предпочтительно указанная стадия (b) детекции присутствия и/или измерения уровня экспрессии HERV-W осуществляется с помощью набора в соответствии с изобретением. Все ранее раскрытые технические признаки применимы в данном документе.

Описание чертежей

Фиг. 1:

A - Уровни транскриптов env и pol HERV-W при включении в исследование, детектируемые различными парами праймеров и зондов для кПЦР.

B - Транскрипт Env HERV-W с праймерами и зондами "env" и "UNO" параллельно для пациентов, включенных в 2 мг/мл когорту (однотонные круги) и 6 мг/мл когорту (однотонные квадраты).

C - Транскрипт Env HERV-W с праймерами и зондами "UNO2", "syn" и "pol" параллельно для пациентов, включенных в 2 мг/мл когорту (однотонные круги) и 6 мг/мл когорту (однотонные квадраты).

Ординаты представляют относительную экспрессию (относительно GUS B) целевой РНК для каждого пациента, а абсциссы представляют различные протоколы кПЦР, примененные на одних и тех же образцах.

Фиг. 2. Разница уровней транскриптов env и pol HERV-W между различными клиническими формами MS при включении в исследование, определенная с помощью различных пар праймеров и зондов для кПЦР: A - протокол "env"; B - протокол "UNO"; C - протокол "UNO2"; D - протокол "syn"; E - протокол "pol".

Ординаты представляют относительную экспрессию (относительно GUS B) целевой РНК для каждого пациента, а абсциссы представляют различные клинические формы MS: первично-прогрессирующий (PPMS), ремиттирующий (RRMS) и вторичный прогрессирующий (SPMS).

Фиг. 3. Соотношение между уровнями транскриптов env и pol HERV-W и клиническими параметрами больных рассеянным склерозом при включении в исследование, определенное с помощью конкретных пар праймеров и зондов для кПЦР: A - протокол "Syn" свидетельствует об отрицательной корреляции между экспрессией HERV-W синцитин-типа и продолжительностью заболевания: коэффициент корреляции Пирсона $r=-0,96$; $p=0,009$; B - протокол "Syn" свидетельствует о положительной корреляции между экспрессией HERV-W синцитин-типа и индексом прогрессии заболевания: коэффициент корреляции

Пирсона - $r=0,95$; $p=0,014$; C - протокол "rol" также свидетельствует о положительной корреляции между экспрессией гена rol HERV-W-типа (кодирующего протеазу, обратную транскриптазу и интегразу) и индексом прогрессии заболевания: коэффициент корреляции Пирсона $r=0,95$; $p=0,048$.

Ординаты представляют длительность заболевания в годах (A) или индекс прогрессии (B & C); абсциссы представляют относительную экспрессию (относительно GUS B) целевой РНК для каждого пациента.

Фиг. 4. Изменение уровней HERV-W-связанных транскриптов в течение первых 6 месяцев GNC002. Данные представляют собой среднее значение экспрессии целевой РНК относительно GUS B для каждого HERV-W-ассоциированного транскрипта в 2 мг/кг когорте (A), в 6 мг/кг когорте (B), а также у всех пациентов, включенных в GNC002 (C). Пунктирные линии обозначают уровень соответствующих транскриптов при включении. Ординаты представляют среднюю относительную экспрессию (относительно GUS B) целевой РНК для каждого протокола кПЦР в группе пациентов. Абсциссы представляют количество инъекций GNbAC1 пациентам.

Фиг. 5. Изменение уровней HERV-W-ассоциированных транскриптов в течение первых 6 месяцев GNC002. Данные представляют собой среднее значение экспрессии целевой РНК относительно GUS B для каждого HERV-W-транскрипта во всех пациентах, включенных в GNC002. Показано изменение уровней транскриптов env и rol HERV-W в ходе лечения MS от даты включения в исследование до даты шестой инъекции, в виде графиков Whiskers (10-90 процентиля) данных от каждого пациента, измеренных с различными парами праймеров и зондов для кПЦР: A - протокол "env"; B - протокол "UNO"; C - протокол "UNO2"; D - протокол "syn"; E - протокол "rol".

Ординаты означают среднюю относительную экспрессию (относительно GUS B) целевой РНК для каждого протокола кПЦР в группе пациентов. Абсциссы представляют число инъекций GNbAC1 пациентам, перед которыми отбирали образцы крови (поэтому "1" соответствуют состоянию перед любой инъекцией, "3" - состоянию 4 недели после второй инъекции и "6" - статусу через 4 недели после пятой инъекции).

Фиг. 6. CH2 клетки спонтанно экспрессируют rol и env-кодируемые HERV-W белки, что определялось с помощью специфического антитела с помощью вестерн-блоттинга.

Кажущаяся молекулярная масса для полос, детектируемых каждым конкретным антителом против gag, rol и env-кодируемых антигенов HERV-W указана в правой части дорожки, соответствующей клеточному экстракту для каждого антигена. Левая дорожка в A, B и C представляет маркеры молекулярной массы, используемые для оценки кДа.

A - HERV-W Gag полипротеин и продукты расщепления, в том числе типичный капсидный белок около 30 кДа.

B - HERV-W rol полипротеин и продукты расщепления, в том числе типичный белок обратной транскриптазы около 55 кДа.

C - белок оболочки HERV-W, продукты расщепления и мультимеры, в том числе SU (поверхностная) и TM (трансмембранная) расщепляемые единицы около 45 и 35 кДа. Гликозилированные продукты env обнаружены с изменением потенциальной вариации в гликозилировании между мономерными полосами, детектируемыми около 75 и 80 кДа. 55 кДа соответствует негликозилированному мономеру, с димером около 100 кДа. Полоса около 160 кДа может быть либо гликозилированным димером, либо негликозилированным тримером.

Фиг. 7. HERV-W rol-кодируемый белок обратной транскриптазы в культурах CH2 с или без обработки GNbAC1 и/или AZT.

Кажущаяся молекулярная масса для обнаруженных полос со специфическим антителом против HERV-W rol-кодируемых антигенов указана в правой части вестерн-блоттинга. Номера дорожек вестерн-блоттинга (от 1 до 6) показаны ниже изображения:

- 1 - комбинированная обработка с помощью GNbAC1 и AZT;
- 2 - обработка только AZT;
- 3 - обработка только GNbAC1;
- 4 - мок-обработанные клетки (без обработки);
- 5 - пустая лунка;
- 6 - маркер молекулярной массы.

Примеры

Пример 1. Подавление экспрессии мРНК человеческого эндогенного ретровируса W-типа у пациентов с рассеянным склерозом, получавших GNbAC1.

GNbAC1 представляет собой моноклональное антитело IgG4 человека, направленное на белок оболочки ретровируса, ассоциированного с рассеянным склерозом (MSRV-ENV), представителя семейства эндогенных ретровирусных элементов HERV-W, также называемый Env HERV-W. GNbAC1 продемонстрировало благоприятный профиль безопасности и линейную фармакокинетику в фазе клинических испытаний, проведенных на здоровых добровольцах.

Текущая GNC002 фаза IIa клинических испытаний была проведена с целью оценки профиля безопасности и фармакокинетики GNbAC1 при 2 и 6 мг/кг на 10 больных рассеянным склерозом. GNC002

заклучалась в 12-месячном лонгитюдном исследовании, в котором GNBAC1 вводили ежемесячно.

Данный анализ был проведен на образцах, собранных в течение первых 6 месяцев GNC002, при этом уровни HERV-W-ассоциированных транскриптов оценивали в реальном времени количественной полимеразной цепной реакцией (кПЦР в реальном времени) в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) из включенных в исследование пациентов. HERV-W транскрипты оценивали разными наборами следующих праймеров/зондов: MSRВ-ENV, HERV-W-UNO, HERV-W-UNO2.

Материалы и методы.

Образцы собирали в 4 мл вакутейнеры СРТ, обрабатывали, хранили и транспортировали в соответствии с протоколом, предоставленным Geneugo в Лабораторном Руководстве GNC002.

Замороженные PBMC от 10 больных с MS были предоставлены двумя рекрутинговыми центрами, которые участвуют в исследовании GNC002.

Химические вещества и биологический материал.

номенклатура	поставщик	Ссылка	Лот №
2-β-меркаптоэтанол	Sigma	M3148-100ml	18596EK
ДНК Zap 1	Амбион	AM9891G	1108021
ДНК Zap 2	Амбион	AM9892G	1108017
Этанол	Fluka	51976-500ml	BCBH0821V
IQ supermix	Biorad	1708862	730001658
IQ supermix с SYBR green	Biorad	170-8882	730001695
Набор «i-script select cDNA synthesis kit»	Biorad	1708897	730001741
безнуклеазная вода	Ambion	AM9932	1303123
PBS pH 7.4 10X	Ambion	AM9625	1305040
QIAshredder (250)	Qiagen	79656	139309935
набор Rneasy mini kit (250)	Qiagen	74106	139314102
набор Turbo DNA-free kit	Ambion	AM1907	1303051

Программное обеспечение:

Biorad CFX Manager 2.0: выполнение и анализ ПЦР;

Genex 5: чистовая обработка необработанных данных ПЦР;

Graph Pad Prism: графики;

SigmaStat: статистический анализ.

В качестве критерия нормальности использовали критерий Колмогорова. Корреляцию определяли анализом смешанного момента по Пирсону, если данные были параметрическими, или анализом рангового порядка по Спирмену, если данные были непараметрическими.

Протоколы.

Вкратце, первый шаг заключался в экстракции суммарной РНК из образцов PBMC. Образцы PBMC выделяли из крови, собранной в СРТ-пробирки и замораживали в 0,5 мл ДМСО с 10% фетальной телячьей сывороткой. После оттаивания образцы PBMC промывали ледяным PBS и экстрагировали общую РНК набором QIAamp RNeasy Mini Kit. Затем получали кДНК ретротранскрипцией всех мРНК, содержащихся в ранее экстрагированной общей РНК. Количественную ПЦР проводили на этих кДНК с добавлением внутреннего стандарта, используемого в качестве калибратора между планшетами (позволяющего стандартизовать значения на протяжении всего эксперимента с несколькими планшетами). Результаты выражали в виде относительной экспрессии мишени РНК (MSRV/HERV-W) к экспрессии РНК GUS B, эталонного гена домашнего хозяйства, со стабильным уровнем экспрессии в популяции MS.

Последовательности праймеров и зондов.

Коммерческим набором праймеров/зондов для детекции контрольного гена домашнего хозяйства, GUS B, является Taqman Gene Expression Assay GusB (Applied biosystem 4448485). VIC® является флуоресцентной меткой-красителем, детектируемой на 5'-конце зонда GusB.

Праймеры и зонды MSRВ-env предназначены для специфической детекции последовательности, кодирующей белок MSRВ-env, а не синцитина. И наоборот, праймеры на синцитин позволяют провести специфическую амплификацию последовательности, кодирующей синцитин, но не MSRВ-env. Флуоресценция метки-красителя FAM™ измеряется на зонде для MSRВ-env и синцитина.

Праймеры на UNO2 разработаны Geneugo для распознавания последовательности MSRВ-env, которая, как предполагается, обладает потенциальной иммуносупрессирующей функцией по аналогии с соответствующей областью в других последовательностях эндогенных ретровирусов; тем не менее, эта терминология ("иммуносупрессивный пептид/последовательность") используется в данном документе для того, чтобы локализовать определенный домен в белках ретровирусной оболочки, которые могут быть не иммуносупрессивными вообще во многих ретровирусах. Эти праймеры могут гибридизоваться с последовательностью, кодирующей также синцитин.

UNO, разработанные Geneuro, связывают последовательности, кодирующие MSR_V-env и синцитин. Для последовательностей, амплифицированных праймерами UNO и UNO2, не создано зондов, и, таким образом, амплификацию этих последовательностей позволяет количественно оценить флуоресценция SYBR green.

Праймеры и зонд MSR_V-pol были разработаны Geneuro и распознают последовательность, кодирующую обратную транскриптазу MSR_V. Детекцию гибридизации зонда MSR_V-pol зонда количественно определяли с помощью флуоресцентного репортера FAM™.

Таблица 4

Последовательность всех праймеров и зондов, используемых
в данном исследовании биомаркеров

МИШЕНЬ:	ОБОЗНАЧЕНИЕ ПРАЙМЕРОВ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (5' → 3')	SEQ ID NO:
Env ретровируса рассеянного склероза	MSRVenv Fwd	5'-CTTCCAGAATTGAAGCTGTAAAGC-3'	11
	MSRVenv Rev	5'-GGGTTGTGCAGTTGAGATTTCC-3'	12
	MSRVenv Probe	FAM-TTCTTCAAATGGAGCCCCAGATGCAG-TAMRA	13
Синцитин-1	Syncytin M fwd	5'-ACTTTGTCTCTTCCAGAATC-3'	14
	Syncytin M rev	5'-GCGGTAGATCTTAGTCTTGG-3'	15
	Syncytin M probe	FAM-ATGGAGCCCAAGATGCA-TAMRA	16
Потенциальная иммуносупрессирующая последовательность	UNO2 fwd	5'-GGCGGTTAGCAAAGTCTAAAG-3'	17
	UNO2 rev	5'-ATGGAACAGGTCCTGACTCC-3'	18
Обе последовательности: синцитин и MSR _V -env	UNO fwd	5'-GTATGTCTGATGGGGTGGAG-3'	19
	UNO rev	5'-CTAGTCCCTTTGTAGGGCTAGAG-3'	20
	Syncytin fwd	5'-TGCCCCATCGTATAGGAGTCT-3'	21
	Syncytin rev	5'-CATGTACCCGGGTGAGTTGG-3'	22
Последовательность MSR _V -pol (обратная транскриптаза)	MSRVpol2 fwd	5'-CCTGTACGTCCTGACTC-3'	23
	MSRVpol2 rev	5'-CTTGGGCTAATGCCTGGCC-3'	24
	MSRV-pol probe 2	FAM-CCAACGTCTCAACTCACCTGG-TAMRA	25
GAPDH	GAPDH fwd	5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGAC-3'	26
	GAPDH rev	5'-TGGCATGGACTGTGGTCATG-3'	27
	GAPDH probe	VIC-AGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCC-TAMRA	28

Флуорофор, детектируемый с помощью амплификатора CFX, находится в 5' части зонда. Для набора праймеров без зонда детекцию осуществляли с помощью интеркалирующего красителя SYBR green.

Анализ результатов.

Критерии исключения для образцов, предотвращающие систематические ошибки оценки в анализе, были следующими:

концентрация РНК в образце ниже 10 нг/мкл, после экстракции и обработки ДНКазой;

стандартное отклонение трех повторов ПЦР выше 0,2 Cq, для одного образца;

Cq (цикл количественного анализа) GUS B выше порога деградации, что указывает на то, что РНК не достигает ожидаемого уровня качества в исследовании. Порог деградации рассчитывается следующим образом: среднее значение $\pm 2 \times$ стандартное отклонение всех индивидуальных значений GUS B Cq.

Все индивидуальные Cq для MSR_V/HERV-W env генов и GUS B стандартизировали в соответствии с их собственными внутренними стандартами, добавленными в каждый экспериментальный планшет, с помощью программного обеспечения Genex® (MultiD analyses AB, Швеция).

Относительную экспрессию каждой целевой РНК в каждом образце рассчитывали следующим образом:

Относительная экспрессия целевой РНК к GUS B = $2^{(Cq_{GUS B} - Cq_{целевой РНК})}$.

Выход экстракции и исключение образцов.

После экстракции общую концентрацию РНК для каждого образца определяли с помощью аппарата Nanodrop®. Все образцы с общей концентрацией РНК ниже 10 нг/мкл исключали. Перед количественной оценкой общей РНК общую РНК обрабатывали ДНКазой для того, чтобы устранить загрязнения геном-

ной ДНК в конечном счете, остающейся в образце общей РНК. После этой стадии с ДНКазой отсутствие контаминации геномной ДНК для каждого образца контролировали с помощью ПЦР без ретротранскрипции (NoRT Ctrl No. 1). Если геномная ДНК обнаруживалась во время этой стадии, соответствующие образцы подвергались второй стадии обработки ДНКазой и второй количественной оценке РНК, а также второй контрольной NoRT (NoRT Ctrl No. 2). Образцы окончательно исключали, если геномная ДНК оставалась в образце или если общая РНК была ниже 10 нг/мкл после этой дополнительной обработки ДНКазой.

Стандартизация исходных данных с помощью Genex® и исключение образцов.

Для того чтобы привести сырые данные, собранные на нескольких микропланшетах для ПЦР, все исходные данные стандартизировали в соответствии с внутренним стандартом, присутствующим на каждом микропланшете с программным обеспечением Genex. Образцы, для которых стандартное отклонение ПЦР в трех повторах составляло больше 0,2 Cq, исключали из исследования. Качество образца отражает уровень экспрессии GUS-B. Все образцы выше порога деградации исключали из исследования.

Результаты.

Уровни HERV-W-ассоциированных транскриптов при включении в исследование В первой временной точке исследования, РВМС выделяли из крови всех объектов перед первым введением GNBAC1 или плацебо. Таким образом, результаты, представленные в табл. 5 и на фиг. 1, соответствуют базальному уровню представляющих интерес HERV-W-ассоциированных транскриптов, для каждого пациента на момент включения в исследование.

Таблица 5

Уровни HERV-W-ассоциированных транскриптов при включении

Образец	Временная точка	Доза (мг/кг)	Относительная экспрессия целевой РНК к GUSB				
			Относительная экспрессия MSR V-env/GusB	Относительная экспрессия UNO/GusB	Относительная Экспрессия UNO2/GusB	Относительная экспрессия Синцитин/GusB	Относительная экспрессия MSR V-pol/GusB
01-0001 12	1	2					
01-0003 12	1	2	0,058	0,151	0,044		0,010
01-0004 12	1	2					
02-0002 12	1	2	0,042	0,099	0,029		0,004
02-0005 12	1	2	0,115	0,418	0,102	0,021	0,013
01-0006 12	1	6	0,104	0,237			0,009
01-0008 12	1	6	0,063	0,278	0,043	0,024	0,011
02-0007 12	1	6	0,061	0,178	0,044	0,009	0,004
02-0009 12	1	6	0,042	0,124	0,035	0,007	0,004
02-0010 12	1	6	0,095	0,404	0,088	0,020	0,014

Распределение результатов от всех пациентов однородно в случае протоколов кПЦР для "env" и "syn", но различия в распределении можно увидеть в случае протоколов UNO и UNO2, несмотря на более низкую относительную экспрессию, детектируемую для РНК, на которую специфически нацелен "UNO2".

Не наблюдалось различий в распределении уровней транскриптов HERV-W при включении в исследование между пациентами, которых включали в когорты 2 и 6 мг/кг и между обоими рекрутинговыми центрами, которые участвовали в исследовании.

Сравнение уровней транскриптов ENV и pol HERV-W с клиническими данными при включении в исследование.

Корреляция клинических параметров с уровнями HERV-W-ассоциированных транскриптов при включении оценивали в соответствии с информацией, суммированной в табл. 6.

Таблица 6

Уровни HERV-W-ассоциированных транскриптов и клиническая информация при включении

Образец	Временная точка	Доза (мг/кг)	Относительная экспрессия целевой РНК к GUSB					Клиническая информация				
			Относительная экспрессия MSR V-env/GusB	Относительная экспрессия UNO/GusB	Относительная Экспрессия UNO2/GusB	Относительная экспрессия Синцитин/GusB	Относительная экспрессия MSR V-pol/GusB	Возраст	Диагноз	Длительность заболевания	EDSS при включении	Индекс прогрессии
01-0001 12	1	2										
01-0003 12	1	2	0,058	0,151	0,044		0,010	49	spms	22	6	0,27
01-0004 12	1	2										
02-0002 12	1	2	0,042	0,099	0,029		0,004	52	spms	14	4,5	0,32
02-0005 12	1	2	0,115	0,418	0,102	0,021	0,013	59	ppms	6	6	1
01-0006 12	1	6	0,104	0,237			0,009	57	rtms	5	2,5	0,5
01-0008 12	1	6	0,063	0,278	0,043	0,024	0,011	51	ppms	2	3	1,5
02-0007 12	1	6	0,061	0,178	0,044	0,009	0,004	62	spms	28	3,5	0,13
02-0009 12	1	6	0,042	0,124	0,035	0,007	0,004	47	spms	22	6,5	0,3
02-0010 12	1	6	0,095	0,404	0,088	0,020	0,014	65	ppms	7	6	0,86

Во-первых, эти результаты свидетельствуют о том, что каковы бы ни были праймеры и зонды, используемые для различных протоколов кПЦР, и независимо от генов HERV-W (env или pol), самые высокие уровни РНК HERV-W были обнаружены у пациентов с PPMS, а самые низкие у пациентов SPMS (фиг. 2). В явном виде получена представляющая интерес новая информация по дифференциальным уровням транскрипционной экспрессии HERV-W у пациентов с двумя различными формами прогрессирующего MS (PPMS и SPMS). Это также может представлять интерес для RRMS, но в данном документе

представлен только один такой случай с промежуточной относительной экспрессией.

Это показывает, что количественное определение транскрипционного уровня HERV-W у пациентов с MS может иметь диагностическое значение и может, например, использоваться для целей поддержки дифференциальной диагностики между случаями SPMS и PPMS. Это также может быть полезно для стратификации порогов кПЦР для определения прогноза или терапевтического мониторинга при PPMS, SPMS и в конечном счете также в случае RRMS.

Во-вторых, несмотря на низкую численность в настоящее время, при использовании протоколов "syn" и "pol" были обнаружены статистически значимые корреляции между транскрипционными уровнями РНК env и pol HERV-W и длительностью заболевания и/или индексом прогрессии. Другие протоколы с использованием различных праймеров и зондов не дали значимые корреляции с клиническими параметрами, что подчеркивает значение выбранного протокола, как показано на фиг. 3.

Это показывает, что выбор протоколов для количественной оценки уровней транскрипции гена env HERV-W синцитин-подтипа (протокол "syn", с SEQ ID NO: 14, 15 и 16) или гена pol в целом (протокол "pol" с SEQ ID NO: 23, 24 и 25) также может иметь особое диагностическое значение в MS. В данном документе протоколы "syn" и "pol" кПЦР могут быть использованы в качестве биомаркера активности HERV-W-ассоциированного заболевания (эволюции прогрессирования заболевания) для клинической стратификации, последующего наблюдения и терапевтического мониторинга. Это также может быть полезно для стратификации заболевания "продолжительность относительно активности" при прогрессирующем MS с помощью "syn" кПЦР, что перспективно для различий в терапевтических стратегиях, которые должны применяться в соответствии с транскрипционным уровнем HERV-W env "синцитин" у пациентов с прогрессирующей эволюцией в течение нескольких лет (в частности, SPMS).

Уровни HERV-W-ассоциированных транскриптов в течение 6 месяцев.

В случае каждого пациента, включенного в исследование, PBMC выделяли из образца крови в 1-й день (включение), 2-, 8-, 15- и 29-й дни. После этого пациенты получили пять дополнительных ежемесячных введений GNBAC1, и PBMC выделяли из образца крови перед каждой инфузией антитела. Таким образом, следующие результаты представляют изменение каждого HERV-W-ассоциированного транскрипта в течение первых 6 месяцев исследования GNC002.

Второе введение GNBAC1 происходило в различные моменты времени после 1-го дня, в зависимости от пациентов. Таким образом, среднее изменение HERV-W-ассоциированных транскриптов оценивали с помощью образцов крови, собранных только перед каждым введением GNBAC1.

В когорте 2 мг/кг наблюдалось снижение уровней всех HERV-W-ассоциированных транскриптов при 6-м введении GNBAC1 по сравнению с базальными значениями при включении в исследование (фиг. 4). Это подтвердилось в 6 мг/кг когорте (фиг. 4). Когда всех пациентов (2 и 6 мг/кг когорты) группировали, уменьшение лучше подтверждалось с помощью протоколов HERV-W UNO, UNO2 и pol кПЦР в течение всего исследования GNC002 (фиг. 4). Это также проиллюстрировано статистическим распределением значений, измеренных перед первой, третьей и шестой инъекцией GNBAC1 у всех пациентов (фиг. 5).

Весьма неожиданно снижение также было отмечено для мРНК pol. Этот эффект не ожидался для антитела, специфически связывающегося с белком Env HERV-W, после инъекции один раз в месяц в течение шести месяцев у пациентов с экспрессией болезнь-ассоциированного HERV-W. Это влияние на мРНК, кодирующую ферменты обратную транскриптазу, протеазу и интегразу, таким образом, представляется уникальным и новым для антитела против Env, такого как GNBAC1. Это свидетельствует о влиянии на глобальную экспрессию самого HERV-W и через его pol-кодируемые продукты, на его репликативную ретровирусную активность. Таким образом, показан антиретровирусный эффект, в частности антиретровирусный эффект, нацеленный на семейство HERV-W.

На фиг. 5 выбор наиболее точных праймеров и зондов для протоколов кПЦР для терапевтического мониторинга групп пациентов, получавших GNBAC1 или любое другое лекарственное средство, мешающее экспрессии HERV-W, представлен "UNO2" для HERV-W env и "pol" для ферментов HERV-W, кодируемых геном pol. Тем не менее, расчет соотношений с помощью фигур, полученных в других протоколах кПЦР, также может представлять диагностической или прогностической интерес.

В этом эксперименте уровни HERV-W-ассоциированных транскриптов у пациентов с MS, включенных в исследование GNC002, оценивали количественной ПНП в реальном времени с использованием различных наборов праймеров, репрезентативных для гена HERV-W env и одного набора праймеров, амплифицирующего последовательности HERV-W pol (в пределах кодирующей области обратной транскриптазы). HERV-W-транскрипты, исследованные в данном документе, обозначены как MSRV-env, HERV-W-UNO, HERV-W-UNO2, HERV-W-syn и MSRV-pol.

Результаты ясно показывают, что эти биомаркеры могут дать представляющие интерес важные биоклинические данные для диагностики рассеянного склероза и для терапевтического мониторинга HERV-W-ассоциированных заболеваний.

Кроме того, уровни HERV-W-ассоциированных транскриптов, как представляется, у пациентов при PPMS выше, чем при SPMS, что подтверждает значение настоящих количественных тестов ПЦР с различными наборами праймеров для биоклинической оценки пациентов и, далее, для целей дифференци-

альной диагностики среди MS прогрессирующих форм (SPMS и PPMS).

Так как уровни всех HERV-W-ассоциированных транскриптов уменьшились в течение первых 6 месяцев GNC002 как в 2 мг/кг, так и в 6 мг/кг когорте, то это подтверждает биоклиническое значение настоящих наборов праймеров и протоколов кПЦР для терапевтического мониторинга пациентов и для оценки биоклинической терапевтической эффективности.

И, наконец, это также обеспечивает биологические доказательства того, что обработка анти-Env HERV-W антителом (например, GNbAC1) пациентов с MS оказывает угнетающее действие на экспрессию HERV-W, которое не ожидалось для уровня env мРНК, но еще в меньшей степени - для pol мРНК. Это четко указывает на эффективность данной обработки анти-ENV антителом против эндогенного ретровируса, ассоциированного с заболеванием человека, поскольку не описывалась с человеческими экзогенными ретровирусами.

Пример 2. Ингибирование белка, кодируемого pol-геном эндогенного ретровируса человека W-типа (обратной транскриптазы), синергично усиливается при комбинированной обработке антителом GNbAC1 и AZT.

А. Антигенная характеристика клеточной культуры, спонтанно экспрессирующей белки gag, pol и env HERV-W

Материалы и методы.

Клеточная культура, спонтанно экспрессирующая белки gag, pol и env HERV-W.

Человеческие клетки CH2 поддерживали в среде IMDM (12440053; Lifetech), дополненной 10% фетальной сыворотки теленка (10270106; Invitrogen), 1% пенициллина/стрептомицина (P4333; Sigma) при 37°C с 5% CO₂.

Экстракция белков.

Клетки CH2 повторно суспендировали в 500 мкл буфера RIPA (R0278, SIGMA), содержащего анти-фосфатазный ингибиторный коктейль cOmplete® (04 693 132001; Roche) и 0,05% LPG (326495-22-1; Avanti polar) при 4°C, выдерживали в течение 2 ч при 26°C на вращающейся платформе и центрифугировали при 10000g в течение 20 мин при 26°C. Надосадочную жидкость собирали и хранили при -20°C.

Вестерн-блоттинг.

Белковые экстракты разводили в 2 раза буфером Лэммли (BioRad) и нагревали в течение 5 мин при 100°C перед загрузкой. Белки разделяли с помощью электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (TGX, BioRad). Гели прогоняли в течение 15 мин при 120 мА в рабочем буфере (Life Technologies). После переноса белков на 0,2 мкм нитроцеллюлозную мембрану (Biorad), мембрану дважды промывали 1× PBS (bioMérieux), содержащем 0,05% Tween20 буфера (Sigma), и блокировали в течение 1 ч с помощью Starting Block (Thermo) на вращающейся платформе при комнатной температуре. Первичные антитела использовали в соответствии с табл. 1, в 1× PBS в течение 1 ч. Затем мембрану промывали три раза и инкубировали в течение 30 мин с конъюгированными с пероксидазой хрена козьими антителами против кроличьих (G21234; LIFETECH, 1/1000 в 1× PBS) или мышинных (115-035-146; Джексон, 1/1000 в 1× PBS) IgG-антител. Представляющий интерес белок детектировали с помощью колориметрической реакции (Opti 4-CN, Biorad), в соответствии с предоставленным протоколом.

Антитела против целевого антигена и разведения антител:

- 1) кроличьи поликлональные pAb1 (SQ09AK001, Squarix), MSRV-ENV, 0,5 мкг/мл;
- 2) кроличья поликлональная сыворотка 330110 J77 (330110 J77, InCellArt), MSRV-pol полипротеин, 1/500; мышинные моноклональные 38E12 (250510, Squarix); полипротеин MSRV-Gag, 1 мкг/мл.

Результаты.

Как видно из фиг. 6, эти клетки экспрессируют все структурные белки HERV-W, которые детектируются специфическими антителами, направленными против gag, pol и env-кодируемых белков.

Следует отметить, что анти-gag антитело обнаруживает gag-кодируемый полипротеин HERV-W и различные расщепленные белки, в том числе более сильно детектирует полосу капсидного P30-подобного белка. Паттерн, детектируемый анти-env антителом, по-видимому, является более комплексным из-за детекции HERV-W Env-кодируемых гликозилированных и негликозилированных мономеров, димеров и тримеров, а также расщепленной единицы SU или TM около 45 и 35 кДа. Анти-pol антитело главным образом детектирует расщепленную обратную транскриптазу, хотя в верхней части геля может быть обнаружена высокомолекулярная полоса (без оценки кДа), которая соответствует нерасщепленному pol-кодированному полипротеину из HERV-W.

В. Белок, кодируемый pol-геном эндогенного ретровируса человека W-типа (обратная транскриптаза), не детектируется в клетках, подвергнутых комбинированной терапии антителом GNbAC1 и AZT.

Материалы и методы.

Клеточная культура хордомы.

Клетки человека CH1 и CH2 (1:1) культивировали совместно для оптимизации роста клеток CH2 и поддерживали в 6-луночных планшетах (CC7672-7506; CytoOne) при плотности 1·10⁶ клеток/луночку в среде IMDM (12440053; Lifetech) с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (10270106; Invitrogen), 1% пенициллина/стрептомицина (P4333; Sigma) при 37°C с 5% CO₂. Клетки обрабатывали

i) AZT (1 мкг/мл, A21-69; Sigma), ii) GNbAC1 (300 мкг/мл, T950111-A; polymun), iii) зидовудин + GNbAC1 или соответствующие контроли с буфером GNbAC1 [20 mM His, 5% сахараза (мас./об.), 0,01% Tween 20 (мас./об.)].

Экстракция белков.

Клетки CH1 и CH2 ресуспендировали в 200 мкл буфера RIPA (R0278, SIGMA), содержащего анти-фосфатазный ингибиторный коктейль cOmplete® (04 693 132001; Roche) и 0,05% LPG (326495-22-1; Avanti polar) при 4°C, инкубировали в течение 2 ч при температуре 26°C на вращающейся платформе и центрифугировали при 10000g в течение 20 мин при температуре 26°C. Надосадочную жидкость собирали и хранили при -20°C.

Вестерн-блоттинг.

Белковые экстракты разбавляли (2:1) в 2X буфере Лэммли (BioRad) и нагревали в течение 5 мин при 100°C перед загрузкой. Белки разделяли с помощью электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (TGX, BioRad). Гели прогоняли в течение 15 мин при 120 мА в рабочем буфере (Life Technologies). После переноса белков на 0,2 мкм нитроцеллюлозную мембрану (Biorad) мембрану дважды промывали 1× PBS (bioMérieux), содержащего 0,05% Tween 20 буфера (Sigma), и блокировали в течение 1 ч с помощью Starting Block (Thermo) на вращающейся платформе в комнатной температуре. Первичные антитела были использованы в соответствии с табл. 1, в 1× PBS в течение 1 ч. Затем мембрану промывали три раза и инкубировали в течение 30 мин с конъюгированными с пероксидазой хрена козьими антителами против кроличьих (G21234; LIFETECH, 1/400 в 1× PBS) или мышиных (115-035-146; jackson, 1/1000 в 1× PBS) IgG-антител. Представляющий интерес белок детектировали с помощью колориметрической реакции (Opti 4-CN, Biorad) в соответствии с предоставленным протоколом. Антитело: кроличью поликлональную сыворотку 330110 J77 (330110 J77, InCellArt), индуцированную против MSRV-pol, разводили 1/500.

Как видно из результатов этого эксперимента, которые проиллюстрированы на фиг. 7, клетки, культивируемые в присутствии комбинации как GNbAC1, так и AZT (дорожка 1), не экспрессировали более детектируемые уровни обратной транскриптазы (RT) HERV-W. При воздействии только AZT (дорожка 2) четкое уменьшение экспрессии RT HERV-W показано соответствующим уменьшенным сигналом окрашенного анти-RT HERV-W антитела; тем не менее, данное уменьшение является частичным эффектом. В дорожке 3 воздействие GNbAC1 отдельно, по-видимому, оказывает незначительное влияние на белок обратной транскриптазы, кодируемый HERV-W pol, что детектировалось в текущих условиях *in vitro*. В качестве параллельного положительного контроля в дорожке 4 показана экспрессия белка RT HERV-W из клеток, подвергшихся только воздействию разбавителя GNbAC1 (буфера для разведения) в качестве мок-обработки, которая демонстрирует нормальное присутствие экспрессируемой в этих клетках RT в этой полосе.

Таким образом, в данном документе показано, что только сочетание анти-Env HERV-W антитела GNbAC1 и азидотимидина (AZT) оказало достаточное воздействие для полного ингибирования выработки RT HERV-W в этой культуре человеческих клеток, экспрессирующих гены gag, pol и env HERV-W в целом, в то время как каждая терапевтическая молекула отдельно оказывала лишь частичное или очень незначительное влияние на эту экспрессию HERV-W. Несмотря на то что это относится к условиям культивирования клеток *in vitro*, этот эффект тем не менее, свидетельствует о безусловном увеличении и главном синергетическом влиянии, оказываемом на эффективность ингибирования экспрессии RT HERV-W данной уникальной комбинацией антитела, нейтрализующего белок Env HERV-W, и антиретровирусного лекарственного средства против обратной транскриптазы. Эти терапевтические молекулы, по-видимому, не оказывают синергического воздействия на экспрессию RT эндогенного ретровируса, такого как HERV-W, тем более, что (i) они специально направлены на совершенно разные молекулы и белковые структуры, (ii) они имеют совершенно разные способы действия (нейтрализация env путем нацеливания на специфический эпитоп и ингибирование ферментативной активности RT) и (iii) одна представляет собой антитело, в то время как другая представляет собой низкомолекулярную молекулу.

Пример 3. Приготовление буферного раствора для композиции антитела GNbAC1, подходящей для внутривенного инъекции человеческим индивидуумам.

Как уже упоминалось в примере 1, GNbAc1 представляет собой IgG4-моноклональное антитело, направленное на белок оболочки ретровируса, ассоциированного с рассеянным склерозом (MSRV-ENV), представителя семейства эндогенных ретровирусных элементов HERV-W, также называемого Env HERV-W. GNbAC1 продемонстрировал благоприятный профиль безопасности и линейную фармакокинетику в фазе I клинических испытаний, проведенных на здоровых добровольцах. Фазу IIa клинических испытаний GNC002 проводили для оценки профиля безопасности и фармакокинетики GNbAC1 при 2 и 6 мг/кг на 10 больных рассеянным склерозом. GNC002 представляло собой 12-месячное исследование, в котором GNbAC1 вводили ежемесячно.

Для внутривенного (в.в.) введения антитела GNbAC1 использовали специальный состав буфера, подходящий для разведения, хранения и инъектирования антитела пациентам: 20 mM гистидин, 5% сахараза, 0,01% полисорбат 20, pH 6,0.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с HERV-W, которая включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, направленные против белка оболочки HERV-W (HERV-W Env), содержащие три CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, и три CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и лекарственное средство - ингибитор ретровирусной обратной транскриптазы.

2. Комбинация по п.1, где указанное лекарственное средство представляет собой азидотимидин (AZT).

3. Комбинация по п.1 или 2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, диатела и мультиспецифичных антител.

4. Комбинация по п.1 или 2, где указанное антитело представляет собой моноклональное гуманизованное антитело.

5. Комбинация по п.1 или 2, где указанное антитело включает тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и

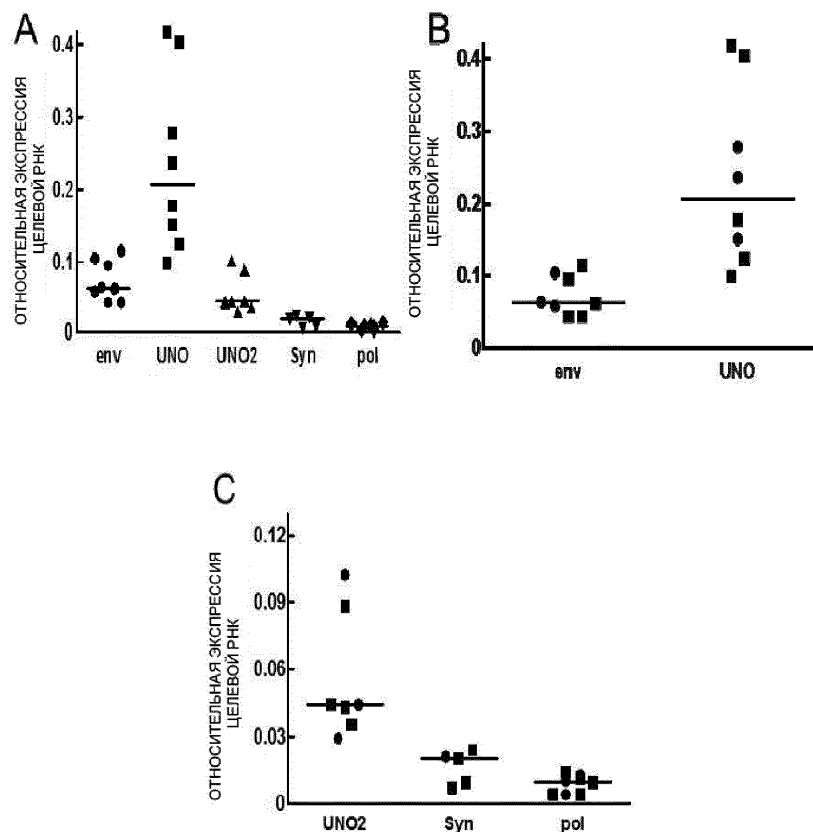
легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

6. Применение комбинации по пп.1-5 для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с HERV-W.

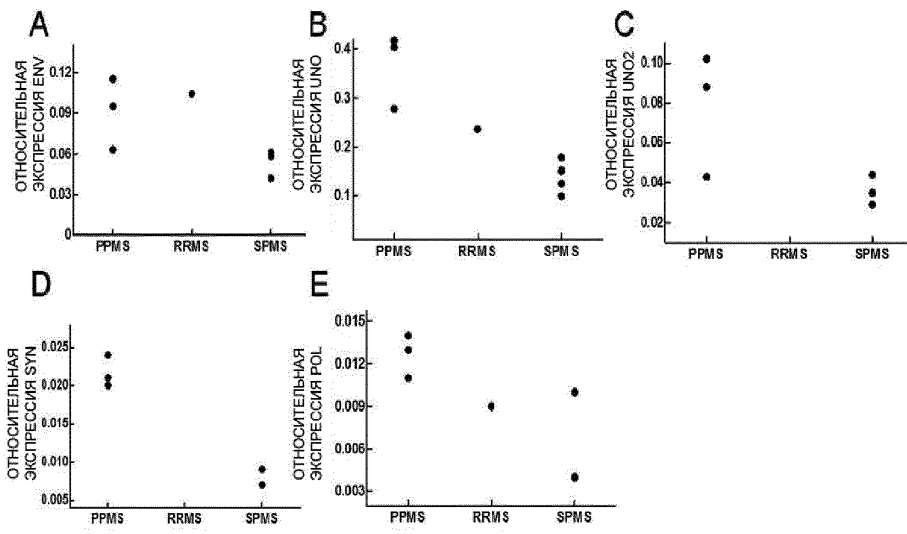
7. Применение по п.6, где указанное заболевание, ассоциированное с HERV-W, выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS), шизофрении (SZ), биполярного расстройства (BP), однополярной или психотической депрессии, клинически изолированного синдрома (CIS, с неврологическим симптомом), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), эпилепсии, псориаза, рака, воспалительного панкреатита и диабета, такого как сахарный диабет 1- или 2-го типа.

8. Применение по п.7, где указанное заболевание, ассоциированное с HERV-W, выбрано из группы, состоящей из рассеянного склероза (MS) и хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP).

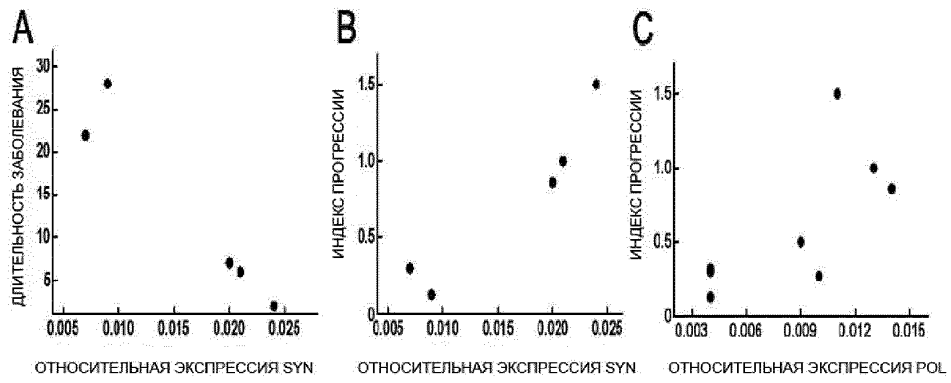
9. Способ предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с HERV-W, включающий введение комбинации по п.1.



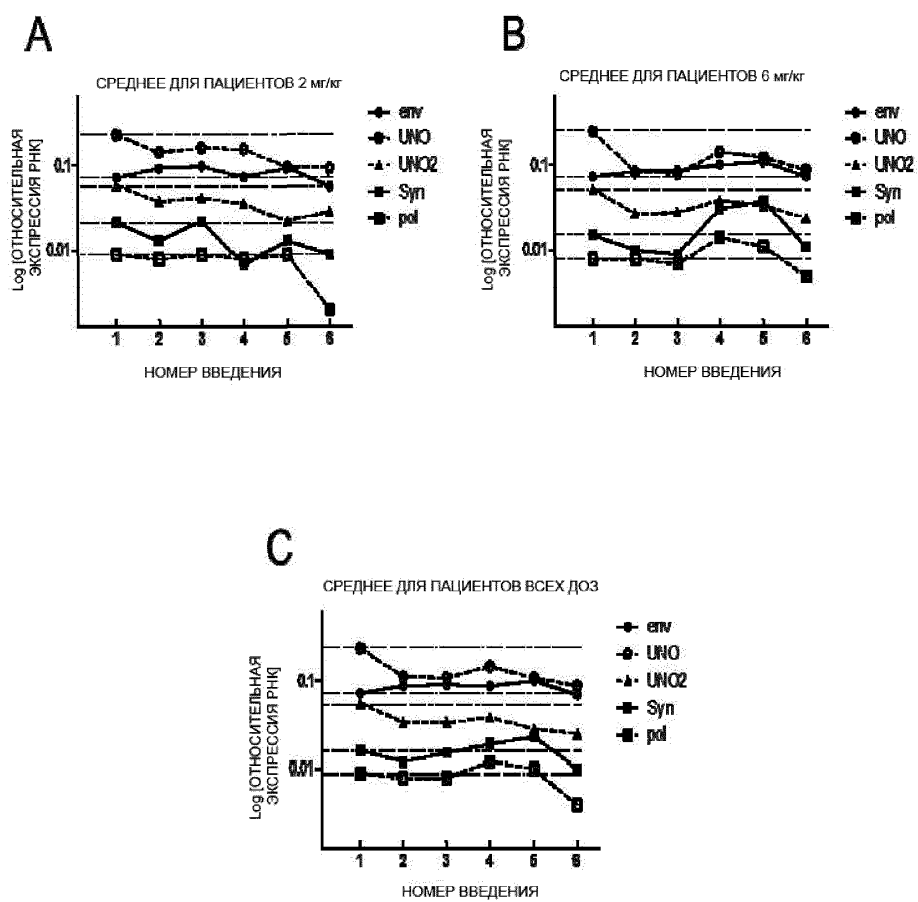
Фиг. 1



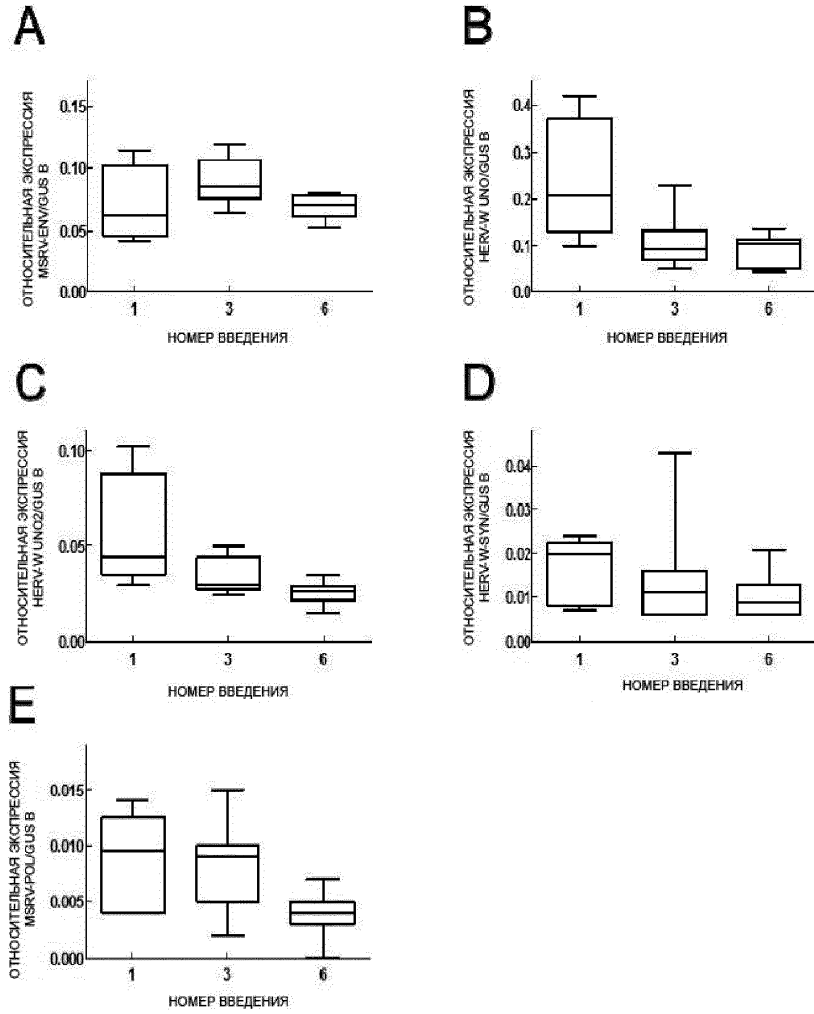
Фиг. 2



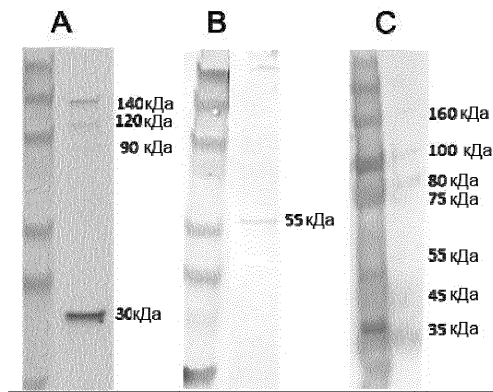
Фиг. 3



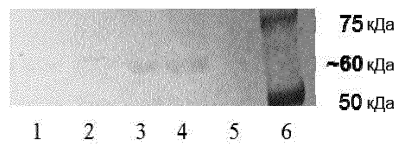
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7