

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 039460

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.28

(21) Номер заявки
201991736

(22) Дата подачи заявки
2018.01.19

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ ОБОЛОЧЕЧНОГО HERV-K И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 17305062.6

(32) 2017.01.20

(33) EP

(43) 2019.12.30

(86) PCT/US2018/014489

(87) WO 2018/136775 2018.07.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЖЕНЁРО СА (CH); ТЕ ЮНАЙТЕД
СТЕЙТС ОФ АМЕРИКА,
ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ ТЕ
СЕКРЕТАРИ, ДЕПАРТМЕНТ ОФ
ХЕЛТ ЭНД ХЬЮМАН СЕРВИСЕЗ
(US)

(72) Изобретатель:
Перрон Эрве (FR), Медина Жюли
(CH), Нат Авиндра, Штайнер Джозеф
Перри, Ли Веньсюэ, Ли Миунг-Хва
(US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2013059426

W. LI ET AL.: "Human endogenous
retrovirus-K contributes to motor neuron disease",
SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol.
7, no. 307, 30 September 2015 (2015-09-30),
pages 307ra153-307ra153, XP055353030, ISSN:
1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aac8201, cited
in the application, abstract, page 10, left-hand column,
paragraph 1; figure 1

WO-A1-2018044970

(57) Изобретение относится к новому антителу против оболочечного HERV-K, которое воздействует на консервативную область, не поддающуюся гликозилированию или естественной конформации, и к его применению в диагностике и/или в терапии.

B1

039460

039460

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к новому антителу против оболочечного HERV-K, которое воздействует на консервативную область, не поддающуюся гликозилированию или естественной конформации, и к его применению в диагностике и/или в терапии.

Уровень техники

Боковой амиотрофический склероз (БАС) - заболевание, которое впервые было описано французским невропатологом Жаном-Мартеном Шарко, и его название отражает как дегенерацию кортико-спинальных мотонейронов, нисходящие аксоны которых показывают измененную структуру в боковых отделах спинного мозга (боковой склероз), так и гибель спинальных мотонейронов со вторичной денервацией, сочетающейся с мышечной атрофией (амиотрофия) (Taylor, Brown и Cleveland, 2016). Действительно, БАС является прогрессирующим и ведущим в конечном итоге к смертельному исходу нейродегенеративным заболеванием, возникающим вследствие дегенерации мотонейронов в двигательной области коры головного мозга, стволовой области мозга и в спинном мозге, вовлеченных в планирование, контроль и выполнение произвольных движений. Смертельный исход в типичном случае наступает спустя 3-5 лет после постановки диагноза (Taylor, Brown и Cleveland, 2016). Распространенность БАС достигает приблизительно 5 случаев на 100000, что отражает быструю летальность заболевания (Taylor, Brown и Cleveland, 2016). Около 10% случаев БАС, по-видимому, передаются генетическим путем в семьях (наследственный БАС) в контексте специфических геномных мутаций. Например, приблизительно 20% семейного БАС связаны с мутацией в гене супероксиддисмутазы (*sod1*) (Vucic и Kiernan, 2009; Rosen, 1993). Другие несемейные случаи классифицируются как спорадический БАС (90% случаев БАС) (Lagier-Tourenne и Cleveland, 2009), подразумевая, что они встречаются без семейного анамнеза.

Нейродегенеративные расстройства, такие как болезни Паркинсона, Хантингтона, Альцгеймера, лобно-височная лобарная дегенерация (FTLD) и БАС, связаны с накоплением неправильно свернутых белков как внутри, так и снаружи нейронных и глиальных клеток в центральной нервной системе (Polymenidou и Cleveland, 2011). Эти неправильно свернутые белковые агрегаты представляют патологические признаки каждого заболевания и могут распространяться от клетки к клетке через прионоподобный механизм после инициирующего события. Одно широко распространенное мнение состоит в том, что эти агрегаты играют критическую роль в инициировании и развитии заболевания с вероятным приобретением неправильно свернутыми версиями эндогенных белков токсических свойств, потенциально через увеличенную гидрофобность и/или секвестрацию необходимых клеточных компонентов внутри таких агрегатов, образование окислительных соединений, ингибирование протеасом и другими путями. Альтернативная точка зрения состоит в том, что крупные агрегаты не представляют токсическую форму в отличие от конечного продукта защитного клеточного ответа, ориентированного на предохранение клеток от воздействия более токсических олигомерных соединений, которые остаются невыявленными большинством методик (Polymenidou и Cleveland, 2011).

Исследования образцов сыворотки, полученных от больных БАС, но серонегативных в отношении экзогенных вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) или вируса человеческого Т-клеточного лейкоза (HTLV), показали ревертазную (RT) активность в 50-60% образцов БАС с уровнем, сопоставимым с таковым у ВИЧ-инфицированных пациентов (MacGowan et al., 2007; McCormick et al., 2008; Andrews et al., 2000; Steele et al., 2005). Это согласуется с тем фактом, что участие ретровирусов подозревалось в течение нескольких лет после выяснения того, что БАС-подобные синдромы способны вызывать ретровирусы как мыши, так и человека (McCormick et al., 2008). БАС-подобное расстройство у ВИЧ-положительных пациентов может стихать под действием антиретровирусной терапии (Moullignier et al., 2001; von Giesen et al., 2002).

Это действительно для симптоматики БАС у ВИЧ-инфицированных пациентов и может, тем не менее, представлять специфическую подкатегорию случаев БАС.

Повышенная RT-активность была также отмечена в сыворотке родственников первой степени больных БАС, что приводит к предположению о том, что активность RT может происходить от унаследованных активных копий человеческих эндогенных ретровирусов (HERV), которые представляют 8% рассматриваемого генома (Steele et al., 2005).

Тем не менее само по себе обнаружение RT-активности при БАС не идентифицирует происхождение этого фермента, однако посмертные исследования мозга выявили участие HERV-K (Douville et al., 2011). Секвенирование показало, что у больных БАС хромосомные локусы 7q34 и 7q36.1 (соответствующие HML-2 и HML-3 подсемействам HERV-K соответственно) экспрессируются более часто по сравнению с контролем (Douville и Nath, 2014). Кроме того, недавно были сделаны наблюдения того, что как gag-pol, так и env РНК HERV-K демонстрируют значительно увеличенную экспрессию в мозге пациентов БАС по сравнению с контролем (Li et al., 2015).

Экспрессия HERV-K в культурах нейронов человека вызвала цитотоксичность нейронов, что наблюдалось по снижению количества нейронов, и также ретракции аксонов дозозависимым образом после трансфекции всего генома HERV-K или только гена HERV-K-env. Было сделано предположение, что свой вклад в нейротоксичность мог внести внутриклеточный белок HERV-K-Env. Оно получило подтверждение в ходе испытания CRISP/casp9, которое показало двукратное увеличение экспрессии HERV-K

при его LTR активации фактором транскрипции VP64 (Li et al., 2015). Экспрессия HERV-K вызывает *in vivo* потерю объема двигательной области коры головного мозга у трансгенных мышей, экспрессирующих ген HERV-K-env в кортикальных нейронах, которая оказывается независимой от иммунной реактивности по данным измерений со связывающей ионизированный кальций адаптерной молекулой 1 (Iba-1), маркером повреждения микроглии (Li et al., 2015). Поведенческие анализы показали, что трансгенные мыши HERV-K-env перемещались на более короткие расстояния, отдыхали в течение более длительных периодов времени и быстрее падали в тестах с вращающимся стержнем, демонстрируя признаки мышечной спастичности с увеличенным сжиманием задних конечностей. В дополнение к этим моторным дисфункциям у трансгенных мышей развивалась глубокая слабость конечностей и спинных мышц, включая задействованные в реализации респираторной функции, приводя к 50%-ной летальности к 10 месяцу (Li et al., 2015).

Интересно, что экспрессия HERV-K RT коррелировала с увеличенными уровнями TDP-43 в нейронах больных БАС, что указывает на то, что экспрессия RT происходит в комбинации с другими связанными с нарушениями клеточных процессов признаками заболевания (Buratti and Baralle, 2009; Geser et al., 2009; Douville et al., 2011). Данные в пользу такого прионоподобного механизма БАС в настоящее время включают основные неправильно свернутые белки SOD1 и TDP-43 (Polymeridou и Cleveland, 2011). Недавно Li et al. продемонстрировали, что TDP-43 мог активировать экспрессию HERV-K-env в человеческом нейроне, что согласуется с их наблюдениями того, что TDP-43 может связываться с областью 726-CCCTCTCCC-734 длинного концевой повтора (LTR) HERV-K (Li et al., 2015). Они также показали, что сайленсинг эндогенного TDP-43 снижал экспрессию HERV-K. Эти результаты были недавно дополнены демонстрацией того, что нормальный TDP-43 не имеет никакого эффекта на транскрипцию HERV-K в человеческих астроцитах и нейронах *in vitro*, тогда как TDP-43 имеет сайт связывания в области U5 промотора HERV-K. Последнее связывание усиливается при воспалении, например, в присутствии фактора некроза опухоли (TNF α) или при ингибировании протеасомы (Manghera, Ferguson-Parry и Douville, 2016). Интересно, что это же исследование показало, что сверхэкспрессия агрегированных форм TDP-43 усиливала экспрессию и накопление вирусного белка HERV-K, когда дикий (нормальный) тип TDP-43 этого не делал (Manghera, Ferguson-Parry и Douville, 2016). Кроме того, несмотря на признаки увеличения количества стрессовых гранул и усиления аутофагической реакции в корковых нейронах БАС, эти клетки были не в состоянии устранить избыточное накопление белка HERV-K. Вероятно, промотор TDP-43 отвечает на ассоциированные с интерфероном и воспалением факторы транскрипции типичным для большинства ретровирусных рестрикционных факторов образом, поскольку он содержит сайты связывания для регуляторных факторов интерферона (IRF1, IRF3) и ядерного каппа-фактора В (NFkB) (Douville et al., 2011).

Взятые вместе, эти обнаружения предполагают, что эндогенные ретровирусные элементы и HERV-K, в частности, включаются в патофизиологию БАС и могут являться недостающим звеном между TDP43 и этой протеинопатией. Экспрессия оболочечного белка HERV-K в нейронах пациентов с БАС может поэтому вносить вклад в нейродегенерацию и патогенез заболевания.

До настоящего времени единственным относительно эффективным лекарственным средством остается рилузол, обеспечивающий симптоматическую терапию и увеличивающий среднюю продолжительность жизни выживающих пациентов лишь на 3-6 месяцев (Hardiman, van den Berg и Kiernan, 2011). Настоящие лечебные протоколы основаны на симптоматической терапии и на сохранении качества жизни, обеспечиваемом мультидисциплинарным подходом. Разработка эффективной терапии остается критической необходимостью для больных с этим быстро прогрессирующим смертельным заболеванием (Hardiman, van den Berg и Kiernan, 2011).

Соответственно, сохраняется неудовлетворенная потребность в эффективных терапевтических средствах для лечения БАС.

Краткое изложение сущности изобретения

Авторы данного изобретения разработали новое антитело против оболочечного белка HERV-K, которое демонстрирует неожиданные свойства.

Авторы изобретения показали, что антитело согласно настоящему изобретению, названное GN_mAb_Env_K01, является мышинным моноклональным антителом (mAb), которое селективно связывается с линейным эпитопом SLDKHKHKQLQSFYP (SEQ ID NO:9) на поверхности белка HERV-K-Env. GN_mAb_Env_K01 представляет собой полноразмерное антитело мышинного подкласса IgG2b/каппа. Биологическая активность GN_mAb_Env_K01 была подтверждена иммунологическими анализами ELISA и вестерн-блоттинг. Как ни удивительно, GN_mAb_Env_K01 распознавал как нативный, так и денатурированный белок HERV-K-Env, а также гликозилированную и негликозилированную формы, в то время как коммерческое anti-HERV-K-Env антитело оказалось не в состоянии обнаружить гликозилированную форму.

Кроме того и наиболее неожиданно, целевой эпитоп оказался очень консервативен и имеет стабильную аминокислотную последовательность в генах HERV-K env, описанных в базах данных.

Это придает данному антителу уникальное позиционирование безотносительно копии HERV-K, во-

влекаемой в патогенную экспрессию оболочечного белка. Эти неожиданные результаты указывают на то, что GN_mAb_Env_K01 является оригинальным инструментом для целенаправленного воздействия на оболочечные белки HERV-K. Они также показывают, что подбор и получение такого моноклонального антитела не могли быть предугаданы или предсказаны данным протоколом иммунизации даже специалистами.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, которое распознает оболочечный белок HERV-K, при этом указанное антитело связывается с эпитопом SLDKHKHKKLQSFYP (SEQ ID NO: 9).

Данное изобретение также относится к применению в терапевтических целях антитела, которое распознает оболочечный белок HERV-K, при этом указанное антитело связывается с эпитопом SLDKHKHKKLQSFYP (SEQ ID NO: 9).

Изобретение также относится к применению антитела, которое распознает оболочечный белок HERV-K и которое связывается с эпитопом SLDKHKHKKLQSFYP (SEQ ID NO: 9), при способе лечения бокового амиотрофического склероза (БАС), предпочтительно спорадического БАС.

В другом объекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанное выше антитело и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В еще одном объекте изобретение также относится к способу детекции оболочечного белка HERV-K в биологическом образце, содержащему стадию введения в контакт указанного биологического образца с указанным выше антителом к оболочечному HERV-K.

В другом объекте изобретение также относится к способу диагностики у пациентов БАС, в частности спорадического БАС, содержащему стадию введения в контакт биологического образца, полученного от указанного пациента, с указанным выше антителом к оболочечному HERV-K.

Подробное описание изобретения

Определения.

В данном контексте термин "лечение" или "терапия" означает для целей настоящего изобретения купирование, облегчение, препятствование развитию или предупреждение расстройства или состояния, к которому такой термин применяется, или купирование, облегчение, препятствование развитию или предупреждение одного или нескольких симптомов расстройства или состояния, в отношении которого такой термин используется.

В данном контексте термин "профилактика" относится к препятствованию возникновению заболевания или состояния у субъекта, который еще не продемонстрировал клинических симптомов, типичных изменений или физиологических дисфункций, которые сделали бы возможным его клиническое диагностирование.

В данном контексте термины "антитело" или "иммуноглобулин" имеют одинаковое значение и применяются в настоящем изобретении на равных основаниях. Термин "антитело" для целей настоящего изобретения относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным участкам молекул иммуноглобулина, т.е. молекулам, которые содержат антигенсвязывающий активный центр антитела, который специфически связывает антиген. Как таковой термин "антитело" охватывает не только целые молекулы антитела, но также и фрагменты антител, а также производные антител.

В данном контексте выражение "фрагмент антитела" относится к участку такого антитела, которое имитирует гипервариабельный участок, такому как CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3). Фрагменты антитела согласно настоящему изобретению сохраняют аффинность связывания и специфичность указанного антитела. Такие фрагменты являются функциональными аналогами указанного антитела, и они связываются по существу с тем же самым эпитопом, как и указанное антитело. Примеры фрагментов антитела включают, но не ограничиваются, тяжелую цепь, легкую цепь, VL, VH, Fv, Fab, Fab₂, F(ab)₂ и F(ab')₂.

В данном контексте понятие "производное антитела" относится к фрагменту антитела изобретения, предпочтительно включающему по меньшей мере один CDR указанного антитела, предпочтительно по меньшей мере один CDR3 указанного антитела, слитый по меньшей мере с одной последовательностью, отличной от природной последовательности (например, линкерная последовательность другого вида животных, ...), при этом указанное производное имеет аффинность связывания и специфичность к HERV-K Env, сопоставимые с этими характеристиками антитела изобретения. Производные антитела согласно настоящему изобретению сохраняют аффинность связывания и специфичность указанного антитела. Такие производные являются функциональными аналогами указанного антитела, и они связываются по существу с тем же самым эпитопом, как и указанное антитело. Примеры производных антитела включают, но не ограничиваются, scFv, (scFv)₂ и димеры.

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

Как правило, легкая цепь включает два домена: вариабельный домен (VL) и константный домен

(CL). Тяжелая цепь включает четыре домена: переменный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3, совместно именуемые CH). Переменные области и легкой (VL), и тяжелой (VH) цепей определяют связывающий участок, специфический к данной антигенной детерминанте. Домены константной области легкой (CL) и тяжелой (CH) цепей ответственны за важные биологические свойства, такие как ассоциация цепей антитела, секреция, трансплацентарная подвижность, связывание комплемента и связывание с Fc-рецепторами (FcR). Fv-фрагмент представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента иммуноглобулина и состоит из переменных участков одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антитела заключается в структурной комплементарности между связывающим сайтом антитела и антигенной детерминантой. Связывающие сайты антитела состоят из таких остатков, которые прежде всего происходят из гиперпеременных или определяющих комплементарность участков (CDR). Иногда на общую структуру домена и тем самым на связывающие сайты влияют остатки из негиперпеременных или каркасных участков (FR). "Определяющие комплементарность участки" или "CDR" относятся к таким аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют аффинность и специфичность связывания природной Fv-области нативного сайта связывания иммуноглобулина. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина содержит три участка CDR, которые обозначаются L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 и H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 соответственно. Таким образом, антигенсвязывающий сайт включает шесть CDR, составляющих комплект CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепей. Каркасные участки (FR) относятся к аминокислотным последовательностям, размещающимся между CDR.

В данном контексте термин "химерное антитело" относится к антителу, которое содержит VH-домен и VL-домен антитела любых видов животных, предпочтительно мыши, а также CH-домен и CL-домен человеческого антитела.

Согласно данному изобретению термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, имеющему переменный каркасный участок и константные области человеческого антитела, но сохраняет CDR антитела любого вида животных, предпочтительно мыши.

Термин "Fab" обозначает обладающий антигенсвязывающей активностью фрагмент антитела с молекулярной массой около 50000, в котором среди фрагментов, полученных при обработке IgG протеазой папаином, около половины N-концевой части H-цепи и вся L цепь связаны друг с другом дисульфидной связью.

В данном контексте термин "F(ab')₂" относится к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу около 100000 и обладающему антигенсвязывающей активностью, который среди фрагментов, полученных при обработке IgG протеазой пепсином, несколько сильнее, чем Fab, связан дисульфидной связью шарнирного участка.

В данном контексте термин "Fab" относится к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу около 50000 и обладающему антигенсвязывающей активностью, который образуется при разрушении дисульфидного мостика шарнирного участка F(ab')₂.

Понятия "одноцепочечный Fv" или "scFv" относятся к полипептиду, который представляет собой ковалентно связанный гетеродимер VH::VL и обычно экспрессируется при слиянии генов, включающему гены, кодирующие VH и VL, соединенные кодирующим пептидом линкером. "dsFv" представляет собой гетеродимер VH::VL, стабилизированный дисульфидной связью. Двухвалентные и поливалентные фрагменты антител могут образовываться спонтанно - при объединении одновалентных scFvs или же могут быть получены посредством соединения одновалентных scFvs пептидным линкером, как, например, двухвалентный sc(Fv)₂.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL). Посредством использования линкера, слишком короткого, чтобы допустить спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, домены вынуждаются спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта.

В данном контексте понятие "антитело изобретения" относится к антителу, направленному против, т.е. специфически связывающемуся с оболочечным белком HERV-K (HERV-K Env), предпочтительно против оболочечного белка HERV-K семейства эндогенных ретровирусов человека типа k (HERV-K), более предпочтительно против эпитопа, определяемого в SEQ ID NO: 9.

В данном контексте термин "биологический образец" для целей настоящего изобретения относится к любому биологическому образцу, получаемому для целей оценки *in vitro*. В настоящем изобретении образец или полученная от пациента проба могут содержать любую жидкость организма или специфическую для заболевания или поражения ткань, например биопсию. Примеры жидкостей организма включают кровь, сыворотку, плазму, аспирационную жидкость из соска молочной железы, мочу, слюну, спинномозговую жидкость и цереброспинальную жидкость (CSF).

В типичном случае антитело изобретения защищает человеческие нейронные клетки от цитотоксичности, вызываемой воздействием на нейроны белка HERV-K Env.

Более конкретно, антитело изобретения предпочтительно демонстрирует один или несколько из

следующих функциональных признаков:

оно сохраняет нейрональную функциональную активность нейронов, подвергшихся воздействию белка HERV-K Env;

оно сохраняет клеточную жизнеспособность нейронов, подвергшихся воздействию белка HERV-K Env; и/или

оно сохраняет нейрональную морфологию нейронов, подвергшихся воздействию белка HERV-K Env.

Защитный эффект антитела согласно изобретению в отношении нейрональной функциональной активности против внеклеточной цитотоксичности оболочечного HERV-K может быть оценен *in vitro*, как показано в примере 2 настоящего изобретения (см. пункт 2.1.3). В частности, такой эффект может быть оценен посредством регистрации спонтанной электрофизиологической активности человеческих нейронов *in vitro* после обработки рекомбинантным белком HERV-K Env. Так, в типичном случае терапия антителом изобретения восстанавливает спонтанную активность человеческих нейронов, подвергнутых воздействию рекомбинантного белка HERV-K Env, по меньшей мере на 50%, в частности, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с человеческими нейронами, не подвергавшимися воздействию указанного рекомбинантного белка HERV-K Env.

В одном воплощении защитный эффект антитела изобретения может быть в качестве варианта или помимо этого оценен *in vitro* посредством анализа жизнеспособности нейрональной культуры после обработки рекомбинантным белком HERV-K Env, что, например, иллюстрируется в примере 2 (см. пункт 2.1.1). В типичном случае в одном таком воплощении терапия антителом изобретения увеличивает жизнеспособность человеческих нейронов, преинкубированных с рекомбинантным белком HERV-K Env, по меньшей мере на 20% по сравнению с жизнеспособностью человеческих нейронов, терапии указанным антителом изобретения не подвергавшихся.

В одном воплощении защитный эффект антитела изобретения может быть в качестве варианта или помимо этого оценен *in vitro* посредством рассмотрения нейрональной морфологии (например, длины нейрита) человеческих нейронов в культуре после обработки рекомбинантным белком HERV-K Env, как, например, иллюстрируется в примере 2 (см. пункт 2.1.2). В типичном случае в одном таком воплощении терапия антителом изобретения увеличивает длину нейритов человеческих нейронов, преинкубированных с рекомбинантным белком HERV-K Env, по меньшей мере на 20% по сравнению с жизнеспособностью человеческих нейронов, обработке указанным антителом изобретения не подвергавшихся.

В одном воплощении антитело изобретения содержит каждый из этих 6 CDR, отображаемых 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 воплощении антитело изобретения содержит:

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

Вышеупомянутая комплементарность, определяющая области (CDR), отображена в табл. 1.

Таблица 1

CDR-домены антитела согласно изобретению

Домены	SEQ-ID NO:	Последовательность
CDR-L1	1	QSLDSDGKTY
CDR-L2	2	LVS
CDR-L3	3	LQATHFPWT
CDR-H1	4	GYTFTSYW
CDR-H2	5	IDPYDSET
CDR-H3	6	ASLYYYGISL

В одном воплощении антитело, фрагмент или производное изобретения содержит:

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

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

Вышеуказанные вариабельные области легкой и тяжелой цепей показаны в табл. 2.

Таблица 2

Легкая и тяжелая вариабельные области антитела
согласно изобретению

Домены	SEQ-ID №	Последовательность
VL	7	DVVMQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRP GESPKLLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEADLGV YYCLQATHFPWTFGGGKLEIK
VH	8	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKRPE QGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCASLYYYGISLWGQGLTIVTS

В одном воплощении антитело, фрагмент или производное изобретения выбирается из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc (Fv)₂, диатела и мультиспецифических антител, образованных из фрагментов антитела.

В одном предпочтительном воплощении антитело изобретения является моноклональным антителом. Моноклональные антитела изобретения являются моновалентными, двухвалентными, мультиспецифическими, моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. В другом воплощении антитело, направленное против HERV-K Env, представляет собой связывающий антиген фрагмент или конъюгат. Например, антитела изобретения могут быть конъюгированы с ингибитором роста, цитотоксическим средством или активирующим пролекарство ферментом.

Другой тип модификации аминокислотных остатков антитела изобретения может быть подходящим для изменения исходного профиля гликозилирования антитела. Под "изменением" имеется в виду удаление одной или нескольких углеводных функциональных групп, обнаруживаемых в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые не присутствуют в антителе. Гликозилирование антител в типичном случае является N-связанным гликозилированием. "N-связанный" относится к добавлению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X может быть любой аминокислотой, служат последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепочке аспарагина. Таким образом, наличие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. Добавление сайтов гликозилирования к антителу удобно обеспечивается при изменении аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования).

В еще одном воплощении антитело изобретения представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, более предпочтительно гуманизированное моноклональное антитело IgG4.

Указанное гуманизированное антитело может быть создано путем получения последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих домены CDR, посредством введения 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 гуманизированного 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). Что касается легкости конструирования экспрессирующего вектора с гуманизированным антителом, легкости введения в животные клетки и баланса между уровнями экспрессии H- и L-цепей антитела в клетках животных, тандемный тип экспрессирующего вектора гуманизированного антитела является более предпочтительным. Примеры тандемного типа экспрессирующего вектора гуманизированного антитела включают pKANTEX93, pEE18 и т.п. В данной области хорошо известны способы получения гуманизированных антител, основывающиеся на применении стандартных методик использования рекомбинантной ДНК и трансфекции генов. Антитела могут быть гуманизированы с помощью различных методик, известных в данной области, включая, например, прививку CDR, венирование (veneuering) или изменение поверхности и перестановку цепи. Также для получения таких антител известна общая технология рекомбинантных ДНК.

Таким образом, одно воплощение данного изобретения относится к моноклональному гуманизированному антителу, содержащему:

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

Фармацевтическая композиция.

Следующая цель изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективную дозу антитела, направленного против оболочечного белка HERV-K (HERV-K Env), и фармацевтически приемлемый наполнитель.

Для образования терапевтических композиций любое описанное выше лекарственное средство по изобретению может быть объединено с фармацевтически приемлемыми наполнителями и, необязательно, с матрицей с замедленным высвобождением, такой как биоразлагаемые полимеры.

Понятие "фармацевтически" или "фармацевтически приемлемый" относится, в зависимости от обстоятельств, к химическим соединениям и композициям, которые не вызывают неблагоприятных, аллергических или других нежелательных реакций при введении млекопитающему, особенно человеку. Фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или вспомогательной композиции любого типа.

Форма фармацевтических композиций, способ приема, дозировка и режим введения естественным образом зависят от состояния проходящего лечение больного, тяжести его заболевания, возраста, массы, пола и т.д.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут быть приготовлены для местного,

перорального, интраназального, интраокулярного, внутривенного, внутримышечного, подкожного и другого подобного введения.

В некоторых воплощениях особенно предпочтительными могут быть композиции, предназначенные для интратекального введения. Действительно, такой способ введения может сделать возможным введение при определенных терапевтических стратегиях в течение непродолжительного времени не являющегося человеческим антителом, такого как антитело мыши, или химерное антитело. Действительно, "иммунная-привилегированная" физиология ЦНС допускает уровень иммунной толерантности, который невозможен при введении через системные пути. Таким образом, режим интратекального введения представляет собой обычную неврологическую и нейрохирургическую практику. Например, ритуксимаб - химерное антитело мыши/человека, которое применяется интратекально у больных с рассеянным склерозом и лимфомой ЦНС (см., в частности, Bonnan M., Ferrari S., Bertandeau E., Demasles S., Krim E., Miquel M., Barroso B. "Intrathecal rituximab therapy in multiple sclerosis: review of evidence supporting the need for future trials. *Curr Drug Targets*". 2014; 15(13):1205-14. Topping J., Dobson R., Lapin S., Maslyanskiy A., Kropshofer H., Leppert D., Giovannoni G., Evdoshenko E. "The effects of intrathecal rituximab on biomarkers in multiple sclerosis". *Mult Scler Relat Disord*. 2016 Mar; 6:49-53. and Kadoch C., Li J., Wong V.S., Chen L., Cha S., Munster P., Lowell C.A., Shuman M.A., Rubenstein J.L. "Complement activation and intraventricular rituximab distribution in recurrent central nervous system lymphoma". *Clin. Cancer Res*. 2014 Feb 15; 20(4):1029-41).

Предпочтительно фармацевтические композиции содержат транспортные средства, которые являются фармацевтически приемлемыми в отношении предназначенной для инъектирования рецептуры. Они могут быть, в частности, изотоническими, стерильными, солевыми растворами (моно- или динатрийфосфатом, хлоридом натрия, калия, кальция или магния и т.п. или же смесями таких солей) либо сухой, особенно лиофилизированной композицией, которая при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического солевого раствора позволяет получать растворы для инъекций.

Применяемые для введения дозы могут быть адаптированы в зависимости от различных параметров и, в частности, в зависимости от используемого способа введения, соответствующей патологии или, в качестве варианта, от ожидаемой продолжительности лечения.

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

Подходящие для применения в виде инъекций фармацевтические формы включают стерильные водные растворы или дисперсии; рецептуры, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный раствор пропиленгликоля; а также стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях такая форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы легко проходить через иглу шприца. 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 приготовлены в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, их смесях и в маслах. При обычных условиях хранения и применения эти препараты могут содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

После приготовления растворы будут вводиться способом, совместимым с данной лекарственной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Рецептуры легко вводятся во множестве различных лекарственных форм, таких, как описанные выше растворы для инъекций, но также возможно применение высвобождающих лекарственных средство капсул и других подобных.

Предпочтительно направленное против оболочечного белка HERV-K (HERV-K Env) антитело настоящего изобретения может быть приготовлено в буфере, в котором оно солибилизируется, хранится и инъектируется пациентам. Упомянутый буфер предпочтительно имеет pH 6,0 и содержит 20 mM гистидина, 5% сахарозы и 0,01% полисорбата-20.

Например, при парентеральном введении в водном растворе такой раствор может быть подходящим образом буферизован, а жидкому разбавителю вначале придают изотонические свойства с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы являются особенно подходящими для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения, в связи с чем специалистам в данной области известны стерильные водные среды, пригодные для использования в свете настоящего описания. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлена к 1000 мл жидкости для гиподермолиза, либо инъектирована в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15-е изд., р. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторые вариации в дозировке обязательно будут иметь место в зависимости от состояния подлежащего лечению пациента. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять подходящую для конкретного больного дозу.

Помимо рецептур, разработанных для парентерального введения, например внутривенной, интрате-

кальной или внутримышечной инъекции, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые материалы для перорального введения; капсулы с замедленным высвобождением и любые другие формы, применяемые в настоящее время.

Диагностические способы изобретения.

В еще одном объекте изобретения также относится к способу детекции оболочечного белка HERV-K в биологическом образце, содержащему стадию введения указанного биологического образца в контакт с указанным выше антителом к оболочечному HERV-K.

В другом объекте изобретения также относится к способу диагностики у пациентов БАС, содержащему стадию введения в контакт биологического образца, полученного от указанного пациента, с указанным выше антителом к оболочечному HERV-K.

В типичном случае такой биологический образец может быть жидкостью организма, такой как цереброспинальная жидкость.

Терапевтический способ и мониторинг в соответствии с изобретением.

В одном объекте изобретения также относится к способу лечения страдающего БАС пациента, содержащему введение указанному пациенту эффективного количества антитела, которое распознает оболочечный HERV-K, как указано выше.

Предпочтительно такой пациент страдает БАС, в частности спорадическим БАС.

Как правило, указанное антитело вводится интратекально, внутривенно или подкожно.

Изобретение также относится к способу лечения пациента, страдающего БАС, в частности спорадическим БАС, содержащему стадии:

1) прогноз течения болезни у больного путем детекции и/или количественного определения вируса HERV-K в биологическом образце; затем

2) если указанная стадия 1) показывает экспрессию человеческого эндогенного ретровируса (HERV) типа K, то способ по настоящему изобретению включает стадию обеспечения указанного пациента антителом по изобретению.

Изобретение также относится к способу мониторинга ответа на лечение пациента, страдающего БАС, в частности спорадическим БАС, при этом указанный способ содержит следующие этапы:

а) лечение указанного пациента антителом согласно изобретению; затем

б) детекция и/или количественное определение HERV-K в биологическом образце указанного пациента.

Согласно изобретению, в случае мониторинга ответа на лечение пациента, страдающего БАС, биологический образец может быть образцом жидкостей организма, таких как кровь, цереброспинальная жидкость, моча или специфическая для заболевания биопсия ткани.

Как правило, стадия детекции и/или количественного определения может быть выполнена согласно обычным методикам, известным специалистам в данной области. Как правило, указанная стадия включает приведение в контакт биологического образца пациента с селективными реагентами, такими как зонды, праймеры, лиганды или антитела, и обнаружение таким образом исходного присутствия в образце интересующих нуклеиновых кислот или белков.

В одном воплощении стадия детекции и/или стадия количественного определения могут выполняться с указанным выше антителом anti-HERV-K.

Пояснения к чертежам.

Фиг. 1. GN_mAb_Env_K01 является IgG2b мышинным антителом и имеет легкую каппа-цепь. Было выполнено изотипирование с помощью ELISA на разбавленном 1:10 супернатанте гибридомы GN_mAb_Env_K01 (моноклональная стадия), захваченной мышинным иммуноглобулином. Детекция различными мышинными антителами с легкими (A) или тяжелыми (B) цепями показала, что GN_mAb_ENV_K01 является мышинным антителом IgG2b/каппа. Результаты отображены на графике в виде среднего удвоенной величины $OD_{450\text{ нм}} \pm SD$.

Фиг. 2. Последовательности легких и тяжелых цепей GN_mAb_Env_K01.

Извлекалась РНК из клеток гибридомы и подвергалась обратной транскрипции в кДНК, которая амплифицировалась ПЦР перед секвенированием с праймерами к кДНК, кодирующей тяжелые (A) и легкие (B) цепи антитела мыши.

(A) CDR1 (жирный шрифт), CDR2 (подчеркнутый шрифт) и CDR3 (полужирный курсив) последовательности легкой каппа-цепи;

(B) CDR4 (жирный шрифт), CDR5 (подчеркнутый шрифт) и CDR6 (полужирный курсив) последовательности тяжелой цепи; константные последовательности мышинового IgG2 (серый курсив).

Фиг. 3. GN_mAb_Env_K01 связывается с эпитопом HERV-K-Env SLDKHKHKKLQSFYP.

Показаны профили интенсивности (слева) каждого пептида из HERV-K-Env (MyBiosource) (справа). Эти перекрывающиеся пептиды 15 аминокислот со смещением одного остатка показали, что GN_mAb_Env_K01 связывается с линейным эпитопом SLDKHKHKKLQSFYP (SEQ ID NO: 9). Результаты представлены в виде интенсивности сигнала (mAU), полученного от CCD камеры, аналогичной ELISA-считывателю стандартного 96-луночного планшета.

Фиг. 4. Гликозилированный HERV-K Env детектируется GN_mAb_Env_K01 при анализе ELISA.

GN_mAb_Env_K01 (A) или Anti-HERV-K-Env от AMSBIO (B) (1 мкг/мл) использовались при анализе ELISA в качестве первичных антител на HEK клеточных лизатах при различных разведениях (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400). В отличие от anti-HERV-K-Env (AMSBio) GN_mAb_Env_K01 распознавал гликозилированный HERV-K-Env. Результаты отображены на графике в виде среднего удвоенной величины $OD_{450\text{ нм}} \pm SD$.

Фиг. 5. Негликозилированный HERV-K Env детектируется GN_mAb_Env_K01 при анализе ELISA.

GN_mAb_Env_K01 или Anti-HERV-K-Env от AMSBIO (1 мкг/мл) использовались в качестве первичных антител при анализе ELISA на 1 мкг/мл his-SUMO-HERV-K-Env рекомбинантном белке E.coli. Оба anti-HERV-K-Env распознали негликозилированный белок HERV-K-Env. Результаты отображены на графике в виде среднего удвоенной величины $OD_{450\text{ нм}} \pm SD$.

Фиг. 6. Детекция HERV-K Env методом вестерн-блоттинг с GN_mAb_Env_K01.

В качестве первичных тел при вестерн-блоттинге использовались Anti-HERV-K-Env (1 мкг/мл) от AMSBIO (лунки #1 и 2) или разбавленный (1:5) супернатант от гибридомы GN_mAb_Env_K01 (лунки #3 и 4). 0,2 мкг меченого his-SUMO HERV-K-Env было осаждено в лунках #1 и 3 и 24,5 мкг белкового экстракта HERV-K-Env трансфицированных HEK клеток было осаждено в лунках #2 и 4. Негликозилированный his-SUMO меченый белок HERV-K-Env детектировался на 75 кДа обоими антителами наряду с мультимерами с высоким молекулярным весом и низкомолекулярными отщепленными фрагментами. Гликозилированный HERV-K-Env (90 кДа) детектировался только с GN_mAb_Env_K01. MW - молекулярная масса.

Фиг. 7. Антитело GN_mAb_Env_K01 (GN K01) специфически защищает человеческие нервные клетки от индуцируемой внеклеточным оболочечным белком HERV-K цитотоксичности: анализ выживаемости клеток.

Нейрональные культуры обрабатывались дифференцирующей средой (см. пример 2) и IgG образцами GN K01 или контрольным неиммунным IgG (Thermo Product # MA 1-10418) в конечной концентрации 3 мкг/мл. По истечении 60-минутного периода предварительной инкубации добавлялся рекомбинантный белок HERV-K Env (My BioSource, аминокислота 90-632, Cat. # MBS1391552) до конечной концентрации 100 нМ. Один образец GN K01 Ig подвергался предварительной инкубации в течение 30 мин с HERV-K Env, а затем добавлялся к человеческим нейронам. В этом эксперименте через 5 дней после обработки Env нейрональные культуры рассматривались с помощью GE INCell Analyzer 2000 BioImager для получения изображений всех лунок (по четыре изображения каждой лунки) в различные моменты времени. Подсчет нейрональных клеток осуществлялся с помощью многопараметрического программного обеспечения для обработки изображений GE Investigator. Стрелка наверху столбца гистограммы показывает результаты с антителом GN_mAb_Env_K01 (GN K01).

Фиг. 8. Антитело GN_mAb_Env_K01 (GN K01) специфически защищает человеческие нервные клетки от индуцируемой внеклеточным оболочечным белком HERV-K цитотоксичности: длина нейрита.

Нейрональные культуры обрабатывались дифференцирующей средой (описанной выше) и IgG образцами GN K01 или контрольным неиммунным IgG (Thermo Product # MA 1-10418) в конечной концентрации 3 мкг/мл. По истечении 60-минутного периода предварительной инкубации добавлялся рекомбинантный белок HERV-K Env (My BioSource, аминокислота 90-632, Cat # MBS1391552) до конечной концентрации 100 нМ. В этом эксперименте через 5 дней после Env-обработки нейрональные культуры рассматривались с помощью GE INCell Analyzer 2000 BioImager для получения изображений всех лунок (по четыре изображения каждой лунки) в различные моменты времени. Средняя длина волокон нейритов определялась с помощью многопараметрического программного обеспечения для обработки изображений GE Investigator.

Фиг. 9. Антитело GN_mAb_Env_K01 (GN K01) специфически защищает человеческие нервные клетки от индуцируемой внеклеточным оболочечным белком HERV-K цитотоксичности: общая электрофизиологическая активность нейронов.

Электрофизиологическая активность, отмечаемая по увеличению импульсной активности в лунках, существенно возрастала к 21 дню *in vitro* и отслеживалась регистрацией спонтанной электрической активности во всех лунках по 5 мин в день. На этом этапе нейрональные культуры обрабатывались дифференцирующей средой (описанной выше) и GN K01 или контрольным неиммунным IgG (Thermo Product # MA 1-10418) в конечной концентрации 3 мкг/мл. По истечении 60-минутного периода предварительной инкубации добавлялся рекомбинантный белок HERV-K Env (My BioSource) до конечной концентрации 100 нМ. После чего, начиная с момента 24 ч после обработки, спонтанная электрическая активность регистрировалась в ежедневном режиме. Для каждой группы обработки через 24 ч после подвергания воздействию HERV-K Env определялась средняя частота пульсации нейронов.

Стрелка наверху столбца гистограммы показывает результаты с антителом GN_mAb_Env_K01 (GN K01). Стрелка наверху столбца гистограммы показывает результаты с антителом GN_mAb_Env_K01 (GN K01).

Примеры

Пример 1. Выработка и характеризование антитела GN_mAb_Env_K01.

1. Материалы и методы.

1.1. Получение моноклонального антитела.

1.1.1. Иммунизация и выделение иммунных клеток.

Три самки мышей (линия Charles River) были иммунизированы меченым his-SUMO белком HERV-K-Env (75 кДа) из E.coli, представленным Mybiosource (MBS1391552), следуя конфиденциальному RAD (Rapid Antibody development - быстрая выработка антитела) протоколу компании Biotem.

Вкратце, в день +10 (D+10) проба крови иммунизированной мыши анализировалась прямым ELISA на рекомбинантный белок HERV-K Env (MyBiosource, MBS1391552) или лизат Escherichia coli в качестве негативного контроля. В D+13 иммунизированные мыши умерщвлялись, из лимфатических узлов отбирались иммунные клетки и трижды промывались 45 мл среды Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, SIGMA, D5671) с последующим центрифугированием в течение 7 мин на 244×g и ресуспендированием в 20 мл DMEM (SIGMA, D5671). Имуноциты иммунизированных мышей (420×10^6 клеток) были смешаны с клетками миеломы (107×10^6 клеток) в экспоненциальной фазе роста в соотношении 1:3,9. Клетки центрифугировались в течение 7 мин на 244×g, и затем осадок ресуспендировался в 1 мл полиэтиленгликоля (PEG), применяемого в качестве фактора слияния (SIGMA, P7181). После стадии отмывания, включающей центрифугирование на 108×g в течение 12 мин, клетки были ресуспендированы в 10 мл DMEM (SIGMA, D5671), 1X гипоксантин-аминоптерин-тимидине (HAT, SIGMA, H0262-10VL), 20% эмбриональной бычьей сыворотке (FCS, PAA, A15-251), 4 mM L-глутамине (SIGMA, G7513) и центрифугировались в течение 7 мин на 244×g. Клетки были ресуспендированы в DMEM (SIGMA, D5671), 1X HAT (SIGMA, H0262-10VL), 20% FCS (PAA, A15-251), 4 mM L-глутамин (SIGMA, G7513) и выдерживались 2 ч при комнатной температуре.

1.1.2. Слияние.

В D-1 иммунодефицитные бестимусные мыши (BIOTEM) были инъецированы 5 мл DMEM (SIGMA, D5671), содержащей 20% FCS (PAA, A15-251), и 2±1 мин спустя были отобраны макрофагоциты из перитонеальной жидкости и культивировались в среде DMEM (SIGMA, D5671).

Клетки селезенки белых мышей BALB/c, иммунизированных эритроцитами овцы, слитыми с клеточной линией миеломы P3X63Ag8, были заранее выделены, характеризованы и сохранялись в BIOTEM. В D-10 эти миеломные клетки были разморожены и культивировались в среде DMEM (SIGMA, D5671) - 8-азагуанин (AZA, SIGMA, A5284) - 10% FCS (PAA, A15-251).

Макрофагоциты бестимусных мышей были подсчитаны и ресуспендированы в концентрации 10^4 макрофагоцитов на 1 мл в DMEM (SIGMA, D5671), 1X HAT (SIGMA, H0262-10VL), 20% FCS (PAA, A15-251), 4 mM L-глутамин (SIGMA, G7513), 1% пенициллин/стрептомицин (SIGMA, P0781). Далее 50 мкл суспензии макрофагоцитов (соответствовавшие 500 макрофагоцитов), применявшихся в качестве фактора роста, были высеваны в 96-луночный планшет с 50 мкл суспензии гибридных клеток. Эти клетки культивировались при 37°C, 5% CO₂ в течение 21 дня.

1.1.3. Клонирование.

Гибридные клетки были разморожены и культивировались с DMEM (SIGMA, D5671), HT (гипоксантин 100 мкМ, тимидин 16 мкМ - SIGMA H0137), 20% FCS (PAA, A15-251), 2% Hybridoma Enhancing Supplement (HES, SIGMA, H6020), 4 mM L-глутамин (SIGMA, G7513), 1% пенициллин/стрептомицин (SIGMA, P0781) в 24-луночном планшете в течение 1 недели при 37°C, 5% CO₂. За один день перед клонированием гибридные клетки были разделены.

В D0 после последовательных разведений в 10^4 , 50, 25, 5 и 2,5 клеток/мл в культуральной среде суспензия гибридомы была высевана в количестве 5, 1 и 0,5 клеток/200 мкл в лунки 96-луночного планшета. В D+6 100 мкл супернатанта из содержащих клетки лунок (отобранных при рассмотрении под оптическим микроскопом) было заменено на свежую среду DMEM (SIGMA, D5671), HT (гипоксантин 100 мкМ, тимидин 16 мкМ - SIGMA H0137), 20% FCS (PAA, A15-251), 2% HES (SIGMA, H6020), 1% пенициллин/стрептомицин (SIGMA, P0781).

После выполнения первого анализа ELISA, соответствовавшего D+10, anti-HERV-K-Env позитивная гибридома была высевана в 24-луночные планшеты (0,5 мл/лунка).

После второго анализа ELISA, соответствовавшего D+14, anti-HERV-K Env позитивная гибридома высевана в планшеты или культуральный флакон (Corning) и 5 виал, содержащих 4 при 5×10^6 клеток, были заморожены при -196°C (жидкий азот) в среде DMEM (SIGMA, D5671), 15% FCS (PAA, A15-251), 4 mM L-глутамин (SIGMA, G7513), 1% HES (SIGMA, H6020), 1% пенициллин/стрептомицин (SIGMA, P0781), 20% диметилсульфоксид (DMSO, Sigma, D2650).

1.2. Анализ ELISA Anti-HERV-K-Env.

96-луночные планшеты maxisorp с коническим дном (NUNC, 449824) были покрыты 50 мкл 1 мкг/мл белка HERV-K Env (Mybiosource, MBS1391552), лизат E.coli (XL1-Blue MRF, Stratagene), HEK клеточный лизат в 1X физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS, BIOTEM) в течение ночи при комнатной температуре. Планшеты были промыты [1X PBS + 0,05% Tween20 (VWR, 28829.296)]

отмывочным буфером (300 мкл/лунка). Неспецифические связывающие сайты были блокированы [1X PBS + 0,05% Tween20 + 2,5% молоко (Regilait)] блокирующим буфером (150 мкл/лунка) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты были промыты [1X PBS + 0,05% Tween20] отмывочным буфером (300 мкл/лунка).

Образцы антитела были разбавлены в [1X PBS + 0,05% Tween20 + 0,5% BSA (VWR, 1.12018.0100)] буфере для разведения. Образцы антитела или очищенного anti-HERV-K-Env от AMSBIO (1 мкг/мл) (50 мкл/лунка) инкубировались в течение 2 чв при комнатной температуре. Планшеты были трижды промыты [1X PBS + 0,05% Tween20] отмывочным буфером (300 мкл/лунка), и в них инкубировался в количестве 50 мкл/лунка поликлональный конъюгированный с пероксидазой affiniPure F(ab)₂ фрагмент козьего антимышиного IgG + IgM (Jackson, 115-036-068) (1/10000 в 1X PBS + 0,05% Tween20 + 0,5% BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывались, и в течение 10 мин при комнатной температуре выполнялась детекция с тетраметилбензидиновым (TMB, Eurobio, 52-00-01) субстратным раствором (50 мкл/лунка). Реакция прекращалась с помощью 0,1 М H₂SO₄ (Merck, 1.12080.1000) (50 мкл/лунка). Была измерена оптическая плотность (OD) на 450 нм с помощью устройства для определения оптической плотности (OD) (Dyplex).

1.3. Получение, очистка, диализ.

Гибридные клетки GN_mAb_Env_K01 были разморожены и культивировались вначале в T75 см², а затем в T300 см² флаконах для тканевых культур (Corning). В итоге 10 по 12×10⁶ клеток культивировалось в 500 мл среды DMEM (SIGMA, D5671), 15% FCS (PAA, A15-251), 4 mM L-глутамин (SIGMA, G7513), 1% HES (SIGMA H6020), 1% пенициллин/стрептомицин (SIGMA, P0781) в Hyperflask (Corning, 10030) при 37°C, 5% CO₂ в течение 10±1 дней.

Культуральный супернатант центрифугировался на 244×g в течение 7 мин, и фильтровался через 11 мкм сетчатый нейлоновый фильтр (SIGMA, NY1104700). Хроматографическая колонка Protein A (GE Healthcare, Mab Select Xtra) была дважды промыта деминерализованной водой и уравновешена 5 объемами 1X PBS (Biotem). Затем было загружено 0,5 л не содержащего клеток культурального супернатанта. Колонка промывалась 5 объемами 1X PBS. При кислом pH с использованием 3,5±0,5 объемов уксусной кислоты (SIGMA, A6283) было выполнено элюирование иммуноглобулина. Элюированные фракции, содержащие иммуноглобулины, были нейтрализованы 100 мкл 1M Tris-буфера с pH 8,8 (Biotem) и хранились при 4°C.

Очищенные фракции IgG были дважды диализированы на 0,5 мл капсуле для микродиализа Quixsep® (Roth, H448-1) со 10 кДа SnakeSkin Dialysis Tubing, 22 мм (ThermoFischer, 68100) в течение 2 ч в 1X PBS при 4°C и сконцентрированы центрифугированием при 4°C на Vivaspinn 20 (30 кДа) (Sartorius, ref). Антитела были отфильтрованы на 0,22 мкм фильтре Minisart® (Sartorius, ref), и концентрация белка была измерена спектрофотометрическим методом на 280 нм.

1.4. Анализ чистоты с помощью SDS PAGE Gel электрофореза (электрофорез в полиакриламидном геле).

Предварительно разведенное в буфере Лэммли (Biotem) антитело (5 мкл в концентрации 0,2 мкг/мкл) нагревалось в течение 5 мин при 95°C и разделялось с помощью электрофореза в 13,5% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), содержащем концентрирующий гель с 5% SDS-PAGE. Гель прогоняли в течение 30 мин при 90 В и затем в течение 2 ч при 120 В. Детекция белка осуществлялась с помощью окрашивающего раствора (Biotem), применявшегося в течение 1 ч при перемешивании. Гель промывался деколоризирующим раствором (Biotem) в течение 1 ч при перемешивании.

1.5. Изотипирование.

1.5.1. Изотипирование с помощью ELISA.

96-луночный планшет maxisorp с коническим дном (NUNC, 449824) покрывался в течение ночи при комнатной температуре 50 мкл 1 мг/мл мышинного иммуноглобулина (Clinisciences, 1010-01). Планшеты были промыты [1X PBS + 0,05% Tween20] отмывочным буфером (300 мкл/лунка). Неспецифические связывающие сайты блокировались [1X PBS + 0,05% Tween20 + 2,5% молоко] блокирующим буфером (150 мкл/лунка) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты были промыты [1X PBS + 0,05% Tween20] отмывочным буфером (300 мкл/лунка). Гибридный супернатант был разведен 1:10 в [1X PBS + 0,05% Tween20 + 0,5% BSA] буфере для разведения. Образец (50 мкл/лунка) инкубировался в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты однократно промывались [1X PBS + 0,05% Tween20] отмывочным буфером (300 мкл/лунка), и в них инкубировались в количестве 50 мкл/лунка конъюгированные с пероксидазой козы антитела против мышинных тяжелоцепочечных (IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM) (Clinisciences, 5300-05) (1/2000 в 1X PBS + 0,05% Tween20 + 0,5% BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывались, и в течение 10 мин при комнатной температуре выполнялась детекция с TMB (Eurobio, 52-00-01) субстратным раствором (50 мкл/лунка). Реакция прекращалась с помощью 0,1 М H₂SO₄ (Merck, 1.12080.1000) стоп-реагента (50 мкл/лунка). Была измерена оптическая плотность (OD) на 450 нм с помощью устройства для определения оптической плотности (OD) (Dyplex).

1.5.2. Изотипирование с помощью иммунохроматографического анализа.

Легкие цепи (каппа или лямбда) характеризовались с помощью иммунохроматографического анализа (LFIA) (ThermoFisher, 26179).

1.6. НЕК трансфекция.

Эмбриональные клетки человека ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) были трансфицированы 1 мкг HERV-K-Env (номер доступа AY037928.1) экспрессирующей плазмидой. Трансфицированные клетки культивировались при 37°C, 8% CO₂ при перемешивании со скоростью 120 об./мин.

1.7. Вестерн-блоттинг.

Рекомбинантный белок HERV-K-Env (Mybiosource) в концентрации 12,5 нг/мкл и белковый лизат трансфицированных клеток НЕК при 1,5 мкг/мкл были разбавлены (1:1) в 2X буфере Лэммли (SIGMA, S3401) и нагревались в течение 5 мин при 90°C. Далее по 32 мкл образцов загружалось на электрофорез в 8-16% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE, Novex, EC60452BOX). Гели прогонялись в течение 1 ч при 160 мА в 1X трис-глицин SDS подвижном буфере (Novex, LC2675). После переноса белков на 0,2 мкм нитроцеллюлозную мембрану (Biorad) в 1X Трис-Глицин гибридационный буфер (Novex, LC3675) мембрана блокировалась в течение 1 ч с помощью [1X PBS + 5% молоко (La Vie Claire)] блокирующего буфера на вращающейся платформе при комнатной температуре. Клеточный супернатант из GN_mAb_Env_K01 гибридомы разбавлялся 1:5 в [1X PBS + 1% молоко] разбавителе антител и использовался в качестве первичного антитела с инкубацией в течение 1 ч. Мембрана затем была трижды промыта по 5 мин в [1X PBS + 0,05% Tween20 (SIGMA, P7949)] отмывочном буфере и инкубировалась в течение 30 мин с разбавленным 1:1000 HRP-конъюгированным козым антителом против мышиного IgG антитела (Jackson, 115035-146). Мембрана была трижды промыта, и представляющий интерес белок детектировался с помощью колориметрической реакции (Opti 4-CN, Biorad) в соответствии с предоставленным протоколом.

1.8. Картирование эпитопов.

Картирование эпитопов выполнялось в Pepscan Presto BV, (Zuidersluisweg 2, 8243RC Lelystad, Нидерланды).

1.8.1. Создание библиотеки пептидов.

Для реконструкции эпитопов целевой молекулы была создана библиотека пептидов. Была получена аминифункционализирующая полипропиленовая подложка прививкой патентованной гидрофильной полимерной рецептуры, образующейся в результате реакции с трет-бутилоксикарбонилгексаметилендиамином (BocHMDA) при использовании дициклогексилкарбодиимида (DCC) с N-гидроксисбензотриазолом (HOBt) и последующем отщеплении Boc-групп трифторуксусной кислотой (TFA). При получении пептидов на аминифункционализированной твердой подложке использовался стандартный Fmoc-синтез пептидов, выполнявшийся с помощью модифицированной по специальному заказу автоматизированной станции дозирования JANUS (Perkin Elmer). Синтез имитаторов структуры белков выполнялся с использованием патентованной технологии Pepscan химически связанных пептидов на каркасах (Chemically Linked Peptides on Scaffolds, CLIPS). Методика CLIPS позволяет задавать структуру белков в виде однократной петли, двойной петли, тройной петли, листовидной структуры, спиралевидной структуры и их комбинаций. Матрицы CLIPS соединяются с цистеиновыми остатками. Боковые цепи множества цистеинов в белках соединяются с одной или двумя матрицами CLIPS. Например, 0,5 мМ раствор P2 CLIPS (2,6-бис-(бромметил)пиридин) растворяется в смеси бикарбонат аммония (20 мМ, pH 7,8)/ацетонитрил (1:3 (по объему)). Этот раствор наносился на пептидные матрицы. Матрица CLIPS связывается с боковыми цепями двух цистеинов, которые присутствуют в связанных с твердой фазой пептидах пептидных матриц (455-луночный планшет с 3 мкл лунками). Пептидные матрицы слегка встряхивались в растворе в течение времени от 30 до 60 мин, находясь при этом в полностью покрытом раствором состоянии. В завершение пептидные матрицы были тщательно промыты избытком H₂O и подвергнуты ультразвуковой обработке в течение 30 мин при 70°C в расщепляющем буфере, содержащем 1% SDS/0,1% бета-меркаптоэтанол PBS (pH 7,2), а затем ультразвуковой обработке в H₂O в течение еще 45 мин. Аналогичным образом были приготовлены T3 CLIPS несущие пептиды, но в этом случае - с тремя цистеинами.

1.8.2. Тестирование методом ELISA.

Связывание антитела с каждым из синтезированных пептидов тестировалось с помощью основывающегося на способе Pepscan методе ELISA. Пептидные матрицы инкубировались при 4°C в течение ночи с содержащим первичное антитело раствором (GN_mAb_Env_K01 в концентрации 1 мкг/мл в буфере Pepscan). После промывки данные пептидные матрицы инкубировались в течение 1 ч при 25°C с взятыми в разведении 1/1000 конъюгированными с пероксидазой хрена кроличьими антителами против мышиных IgG (H+L) (Southern Biotech; табл. 4). После промывки были добавлены пероксидазный субстрат 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолин сульфонат (ABTS) и 20 мкл/мл 3%-ной H₂O₂. Спустя 1 ч оценивалось развитие окраски. Развитие окраски количественно определялось с помощью системы, состоящей из устройства с зарядовой связью (charge coupled device, CCD): камеры и системы обработки изображений. Величины, полученные с помощью CCD-камеры, находились в диапазоне от 0 до 3000 mAU, аналогично стандартному ELISA-считывателю 96-луночного планшета.

1.9. Секвенирование.

Высококачественная РНК была выделена и очищена из гибридомных клеток с помощью набора PureLink RNA Mini Kit (Life technologies, 12183018A) и проконтролирована на агарозном геле. Исходя из очищенной общей РНК, далее был использован Superscript enzyme (Invitrogen, 18064022) для синтеза первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) согласно полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью набора HotStar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen, 202602) и вырожденных праймеров (Biotem design), специфических к кДНК, кодирующей тяжелые и легкие цепи мышинового антитела. Продукты ПЦР контролировались в агарозном геле и подвергались секвенированию (секвенирование двухцепочечных образцов). Полученные последовательности были проанализированы для сборки и контроля качества с помощью специальных биоинформационных инструментов (Blast - ClustalW) и транслировались в пептидные последовательности.

1.10. Композиция буфера Biotem.

Таблица 3

Композиция буфера Biotem

Раствор	Композиция
10 x PBS	80 г NaCl; 2 г KCl; 28,7 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 2,4 г K_2PO_4 в 1 л деионизированной воды
1 x PBS	100 мл 10 x PBS; 900 мл деионизированной воды
Буфер Лаэммли (4 x)	0,5 мл 2,5 М Tris pH 6,8 (ICN, 103133); 0,6 г 12% додецилсульфата натрия (ICN, 102918); 0,01 г 0,2% бромфенолового синего; 2 мл 40% глицерина (SIGMA G7757); qsp 5 мл H_2O (восстановительные условия: 1 мл 20% 2-меркаптоэтанола (SIGMA M7154))
13,5% разделяющий SDS PAGE	9 мл 30% акриламида (SIGMA A3699); 5 мл 1,5 М Tris pH 6,8 (ICN, 103133); 200 мкл 10% додецилсульфата натрия (ICN, 102918); 5,8 мл H_2O ; 150 мкл персульфата аммония (APC, ICN, 802811); 15 мкл TEMED (ICN, 805615)
5% концентрирующий SDS PAGE	1,6 мл 30% акриламида (SIGMA A3699); 2,5 мл 1,5 М Tris pH 6,8 (ICN, 103133); 100 мкл 10% додецилсульфата натрия (ICN, 102918); 5,8 мл H_2O ; 150 мкл персульфата аммония (APC, ICN, 802811); 15 мкл TEMED (ICN, 805615)
10 x рабочий буфер	288 г глицина (SIGMA G7126); Tris-основание (ICN, 103133); 20 мл SDS (ICN, 102918); qsp 2 л H_2O
Окрашивающий раствор	45 мл уксусной кислоты (SIGMA, A6283); 278 мл 90% этанола; 177 мл H_2O ; 0,75 г реагента бриллиантовый синий (SIGMA, B7920)
Деколоризирующий раствор	75 мл уксусной кислоты (SIGMA, A6283); 56 мл 90% этанола; 869 мл H_2O

2. Результаты.

С использованием специфических антител к иммуноглобулину, способных к детекции различных тяжелых и легких цепей моноклональных антител, было показано, что GN_mAb_Env_K01 детектировался антителами к легким каппа-цепям (фиг. 1A) и к тяжелым цепям IgG2b (фиг. 1B).

Были секвенированы тяжелые и легкие цепи GN_mAb_Env_K01, что показало их три CDR участка (фиг. 2) и подтвердило как IgG2b тяжелые, так и каппа-легкие цепи.

2.1. GN_mAb_Env_K01 распознает линейный эпитоп SLDKHKHKKLQSFYP из поверхностного блока HERV-K-Env.

Выполненное с помощью панели с 529 пептидами из последовательности процессированного белка HERV-K-Env от Mybiosource (без сигнального пептида и процессированного трансмембранного домена) картирование эпитопа в условиях высокой жесткости обнаружило, что антитело GN-mAb-Env_K01 связано с линейным пептидом через SLDKHKHKKLQSFYP сердцевинную последовательность (фиг. 3, левая панель). Этот эпитоп содержится внутри внеклеточного домена белка HERV-K-Env (фиг. 3, правая панель), соответствующая области 298-312 белка HERV-K-Env согласно описанию Dewannieux et al. (Dewannieux, Blaise и Heidmann 2005). Сравнение этого эпитопа с использованием сервиса Blastp из базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) выявило, что он представляет собой высоко-стабильную антигенную детерминанту, со 100% гомологией соответствуя в пределах верхних 100 бласт-хитов последовательностям HERV-K-Env (данные не показаны).

2.2. GN_mAb_Env_K01 распознает гликозилированные и негликозилированные белки HERV-K-Env в неденатурирующих условиях.

Авторы также проанализировали способность GN_mAb_Env_K01 распознавать гликозилированный HERV-K-Env. С этой целью человеческая эмбриональная клетки почек (HEK) были трансфицированы плазмидой, кодирующей белок HERV-K-Env. Несмотря на несколько предпринятых с различными буферами попыток, авторам не удалось экстрагировать растворимый белок HERV-K-Env (данные не показаны). Однако эта нерастворимая фракция гликозилированного белка HERV-K-Env из лизата трансфицированных клеток HEK при использовании ELISA смогла показать, что GN_mAb_Env_K01 специфически распознает гликозилированный антиген HERV-K-Env (фиг. 4, левая панель). В противоположность этому, классическое коммерческое моноклональное антитело (mAb) к HERV-K-Env (HERM-1821-5, IgG2b) от AMSBIO (фиг. 4, правая панель) гликозилированный HERV-K-Env не обнаруживало.

Данные результаты показывают, что GN_mAb_Env_K01 биологически активен в ELISA и подтверждают то, что эпитоп SLDKHKHKKLQSFYP доступен в денатурирующих условиях.

Хотя и GN_mAb_Env_K01 и mAb Anti-HERV-K-Env (HERM-1821-5, IgG2b) от AMSBIO распознавали нативный his-SUMO меченый рекомбинантный HERV-K-Env из E.coli (фиг. 5), оказалось, что GN_mAb_Env_K01 продемонстрировал намного более высокую способность к детекции по сравнению с Anti-HERV-K-Env mAb-эквивалентом от AMSBIO (фиг. 5), когда оба проверялись при одной и той же концентрации (1 мкг/мл). Это свидетельствует о более высокой аффинности GN_mAb_Env_K01 к HERV-K Env.

Как показано на фиг. 6, и GN_mAb_Env_K01, и mAb Anti-HERV-K-Env (HERM-1821-5, IgG2b) от AMSBIO распознавали денатурированный his-SUMO меченый рекомбинантный HERV-K-Env из E.coli, что наблюдалось в виде отвечающего 75 кДа сигнала.

Важно, что GN_mAb_Env_K01 также обнаруживает денатурированные HERV-K-Env гликозилированные белки из трансфицированных HEK клеток, что наблюдалось как сигнал при 90 кДа, в то время как никакого сигнала с антителом anti-HERV-K-Env от AMSBIO отмечено не было. В дополнение к предыдущим результатам ELISA с денатурированными белками, GN_mAb_Env_K01 биологически активен при вестерн-блоттинге. Поэтому антигенная детерминанта SLDKHKHKKLQSFYP также доступна в денатурирующих условиях.

3. Выводы.

Настоящий отчет показывает, что после иммунизации мыши, серологического тестирования и выбора моноклональной гибридомы было получено продемонстрировавшее неожиданные свойства моноклональное мышинное антитело (названное GN_mAb_EnvK-01), распознающее антигенную детерминанту HERV-K-Env SLDKHKHKKLQSFYP.

Биологическое сравнение с другим mAb к HERV-K Env (HERM-1821-5, IgG2b) от AMSBIO подтверждает, что, несмотря на их сходное происхождение (мышинное), изотип (IgG2b, каппа) и белок-мишень (белок HERV-W-Env), GN_mAb_EnvK-01 предпочтителен, поскольку, распознавая как гликозилированные, так и негликозилированные белки, при этом демонстрирует высокую аффинность и в нативных, и в денатурирующих условиях. Кроме того, из описанных в базах данных различных многочисленных копий антитела GN_mAb_EnvK-01 нацелены на устойчивый и консервативный эпитоп в последовательностях оболочечного HERV-K.

Поэтому GN_mAb_EnvK-01 представляет собой полезный инструмент не только в отношении иммунологических анализов, но также и для терапевтических применений против белков HERV-K Env в качестве терапевтических мишеней, например, при БАС. Его устойчивая последовательность эпитопа среди копий HERV-K, его высокая аффинность и его эффективное связывание с нативными гликозилированными формами отвечают актуальным требованиям, предъявляемым к действенному терапевтическому средству для лечения, например, больных БАС, при котором, по-видимому, происходит значимое экспрессирование различных копий HERV-K.

Пример 2. Антитело gn_mab_env_k01 (gn k01) эффективно нейтрализует нейротоксичность оболочечного HERV-K по отношению к человеческим нейронным клеткам.

1. Методы и материалы.

1.1. Человеческие нейронные клетки.

Были приготовлены полученные из человеческих нейрональных стволовых клеток (neural stem cell, NSC) нейронные культуры, как описано (Efthymiou, Shaltouki et al., 2014).

Вкратце, NSC были распределены в 96-луночной планшете с покрытием из 0,002% поли-L-орнитина (Sigma, St. Louis, MO) и 10 мкг/мл ламинина (Life Technologies) в количестве от 7500 до 10000 клеток/см² и через 24 ч после посева была добавлена нейронная дифференцирующая среда. Данная дифференцирующая среда содержала DMEM/F12 с GlutaMax, 1,8% альбумина бычьей сыворотки (BSA), конглоутинин 1× StemPro hESC (все - Life Technologies), 10 нг/мл нейротрофического фактора головного мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) и глиального нейротрофического фактора (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF; R&D Systems, Minneapolis, MN), клетки снабжались свежей средой и факторами роста раз в два дня. В испытаниях нейротоксичности нейроны использовались в день 7-12 in vitro.

1.2. Испытания нейротоксичности.

1.2.1. Морфология и жизнеспособность нейронов.

Культуры человеческих нейронов (15-20000 клеток/лунку), стабильно экспрессирующие флуоресцентный белок Td-Tomato для меченья клеток, высевались на 96-луночной планшете, как описано выше, и выдерживались при 37°C в увлажненном инкубаторе для тканевых культур в атмосфере с 5% CO₂. Нейрональные культуры обрабатывались дифференцирующей средой (описанной выше) и IgG образцами GN K01 или контрольным неиммунным IgG (Thermo Product # MA 1-10418) в конечной концентрации 3 мкг/мл. По истечении 60-минутного периода предварительной инкубации добавлялся рекомбинантный белок HERV-K Env (My BioSource, аминокислота 90-632, Cat # MBS 1391552) до конечной концентрации 100 нМ. Один образец GN K01 Ig подвергался предварительной инкубации в течение 30 мин с HERV-K Env, а затем добавлялся к человеческим нейронам. Нейрональные культуры рассматривались с помощью

GE INCell Analyzer 2000 BioImager для получения изображений каждой лунки (по 4 изображения каждой лунки) в различные моменты времени через 24, 48, 72 ч после обработки. Многопараметрический анализ/обработка изображений были обеспечены с помощью аналитического программного обеспечения GE Investigator 1.93. Для каждого образца было выполнено количественное определение жизнеспособности нейронов, длины нейритов и других морфологических параметров. С помощью программы Graph Pad Prism 7.02 было выполнено отображение данных в графической форме.

1.2.2 Электрофизиологический анализ.

Электрофизиологический анализ, выполняемый с помощью микроэлектродного массива Axion Maestro microelectrode array (MEA).

При посеве для анализа культуры человеческих нейронов применялись 48-луночные планшеты t-MEA. Эти планшеты содержат по 16 активных отводящих электродов на лунку. В каждую лунку планшета t-MEA было помещено по 200000 нейронов и культуры поддерживались при 37°C в увлажненном инкубаторе для тканевых культур в атмосфере с 5% CO₂. Электрофизиологическая активность, отмечаемая по увеличению амплитуды импульсов в лунках, существенно возрастала к 21 дню *in vitro* и отслеживалась регистрацией спонтанной электрической активности во всех лунках по 5 мин в день. На этом этапе нейрональные культуры обрабатывались дифференцирующей средой (описанной выше) и IgG образцами GN K01 или контрольным неиммунным IgG (Thermo Product # MA 1-10418) в конечной концентрации 3 мкг/мл. По истечении 60-минутного периода предварительной инкубации добавлялся рекомбинантный белок HERV-K Env (My BioSource) до конечной концентрации 100 нМ. В этих условиях вначале к клеткам добавляется антитело без Env, воспроизводя, таким образом, условия леченых пациентов с наличием в их мозговой ткани диффундировавшего в нее терапевтического антитела. После этого добавляется активный Env белок (не инкубированный предварительно с антителом, не подвергавшийся предварительно нейтрализации и не добавляемый в виде неактивного белка), воспроизводя, таким образом, экспрессию патогенного белка с внеклеточной секрецией в экстрацеллюлярном пространстве. Один образец GN K01 Ig подвергался предварительной инкубации в течение 30 мин с HERV-K Env, а затем добавлялся к человеческим нейронам. После чего, начиная с момента 24 ч после обработки, спонтанная электрическая активность регистрировалась в ежедневном режиме. Количественная оценка электрической активности была выполнена с помощью программного обеспечения Axion Axis. Для каждой обработки были определены такие параметры, как количество спайков, средняя частота пульсации и количество пачек импульсов.

2. Результаты.

2.1. Внеклеточный оболочечный белок HERV-K является токсичным по отношению к нейронным клеткам человека, и его токсичность специфически ингибируется антителом GN_mAb_Env_K01 (GNK01).

2.1.1. Жизнеспособность нейронов.

Культуры нейронов человека, обработанные 100 нМ рекомбинантного белка HERV-K Env, продемонстрировали значимую нейротоксичность, приводя к существенной утрате нейронных клеток в последующие дни. Эффекты HERV-K Env были количественно определены в день 5 после подвергания воздействию белка HERV-K Env. Авторы наблюдали, что нейроны, обработанные Env + GN K01 Ig (3 мкг/мл), имели повышенную выживаемость по сравнению с нейронами, обработанными Env. При анализе через пять дней после добавления к культуральной среде оболочечного белка HERV-K клетки, обработанные Env плюс 3 мкг/мл контрольного неиммунного IgG антитела, продемонстрировали аналогичную токсичность. Нейроны, обработанные 3 мкг/мл GN K01 либо перед воздействием HERV-K Env, либо предварительно инкубировавшиеся с Env и затем получившие такую обработку, показали значительно более высокую жизнеспособность, таким образом подтверждая эффективность антитела GN K01 в отношении нейтрализации токсичности белка HERV-K Env (фиг. 7).

2.1.2. Длина нейритов в нейронах.

Параллельно было проанализировано влияние HERV-K Env на среднюю длину нейрита, и добавление GN K01 (3 мкг/мл) к подвергшимся воздействию Env нейронам значительно увеличило длину нейрита по сравнению с нейронами, обработанными Env или Env + контрольное неиммунное Ig (фиг. 8).

2.1.3. Функциональная активность нейронов.

Были проведены электрофизиологические исследования с системой Axion Maestro MEA для оценки того, привела ли обработка HERV-K Env к функциональным изменениям спонтанной электрической активности, которая является главным признаком нормальной нейронной деятельности. После культивирования культур нейронов человека на 48-луночных планшетах MEA в течение 21 дня эти культуры были инкубированы в дифференцирующей среде (описана выше) либо с GN K01, либо с контрольным неиммунным IgG (Thermo Product # MA 1-10418) в конечной концентрации 3 мкг/мл. По истечении 60-минутного периода предварительной инкубации был добавлен рекомбинантный белок HERV-K Env (My BioSource, Cat # MBS1391552) до конечной концентрации 100 нМ. Один образец GN K01 Ig подвергался предварительной инкубации в течение 30 мин с HERV-K Env, а затем добавлялся к человеческим нейронам. После чего, начиная с момента 24 ч после обработки, регистрировалась спонтанная электрическая активность. Через 24 ч после обработки HERV-K Env количество спайков и средняя частота пуль-

сации уменьшились на 40%. Нейроны, подвергнутые воздействию HERV-K Env плюс обработка контрольным неиммунным IgG, показали уменьшение количества спайков и средней частоты пульсации на величину около 30%. Наиболее интересно то, что нейроны, подвергнутые воздействию к HERV-K Env плюс GN K01, показали количество спайков и среднюю частоту пульсации, подобные лункам, инкубированным только с контрольными питательными средами, таким образом демонстрируя полное подавление патогенного воздействия HERV-K Env на общую функциональную активность нейронов (фиг. 9).

3. Выводы.

Поэтому эффективность антитела GN K01 была специфической, а его благоприятные эффекты против патогенных последствий подвергания нейронов воздействию белка HERV-K Env были подтверждены его значительным (i) сдерживанием гибели клеток, (ii) сохранением морфологии клетки нейрона и длины нейрита и (iii) полным восстановлением функциональной активности нейронов по результатам измерений электрофизиологической активности в присутствии патогенного белка HERV-K Env против такого же подвергания действию HERV-K Env с нерелевантным контрольным антителом или без антитела.

Поэтому (i) с учетом специфической детекции белка HERV-K Env в измененных нейронах внутри мозговой паренхимы больных со спорадическим БАС было показано и (ii) с учетом подтверждения идеи о том, что этот белок HERV-K Env сам по себе обуславливает патогенность, проявляющуюся в клинической и гистологической симптоматике спорадического БАС, воспроизводимой на трансгенных мышах, экспрессирующих HERV-K env ген, кодирующий этот уникальный белок (Li, Lee et al., 2015), специфическая эффективность антитела GN K01, как демонстрируется авторами данного изобретения на релевантных клеточном и функциональном аспектах нейронов человека, это доказывает его терапевтическую ценность при БАС, в частности при спорадическом БАС.

Специфическая активность такого антитела, по-видимому, нейтрализует (т.е. лечит) патогенные эффекты оболочечного HERV-K (Env) белка, который, как было показано, непосредственно связан с БАС патогномоничными нейрональными поражениями в мозге больных со спорадическим БАС и воспроизводит те же самые нейрональные альтерации при добавлении к культивируемым нейронам или когда экспрессируется в качестве единственного трансгена у мышей в комплексе с такими же клиническими симптомами, как при БАС. Кроме того, добавление антитела GN K01 в присутствии патогенного белка HERV-K Env демонстрирует его более значимую эффективность, чем преинкубация GN K01 с рекомбинантным белком HERV-K Env *in vitro*, что показывает его оптимальную эффективность в физиологических условиях и поэтому в терапевтических применениях.

Токсичность белка HERV-K подразумевает не только известную ранее внутриклеточную экспрессию в трансфицированных клетках-мишенях или в нейронах трансгенных животных, но также включает секретированный внеклеточный белок HERV-K, патогенный к наивным (нетрансфицированным HERV-K или сверхэкспрессирующим) нейронам. Поэтому антитело изобретения также защищает человеческие нейронные клетки от паракринного распространения цитотоксичности, вызываемой подверганием нейронов воздействию секретированного и/или экстрацеллюлярного белка HERV-K Env. Косвенным образом это также относится к аутокринной цитотоксичности белка HERV-K Env, продуцируемого в нейронах, экспрессирующих или сверхэкспрессирующих кодирующий HERV-K Env ген(ы).

В заключение антитело по изобретению, специфически нацеленное на оболочечный белок HERV-K, способно нейтрализовать его патофизиологические свойства, наблюдаемые при БАС, в частности при спорадическом БАС, или на HERV-K Env трансгенных мышинных моделях, воспроизводящих признаки БАС.

Ссылки:

- Alfahad, T., and A. Nath. 2013. 'Retroviruses and amyotrophic lateral sclerosis', *Antiviral Res*, 99: 180-7.
- Andrews, W. D., P. W. Tuke, A. Al-Chalabi, P. Gaudin, S. Ijaz, M. J. Parton, and J. A. Garson. 2000. 'Detection of reverse transcriptase activity in the serum of patients with motor neurone disease', *J Med Virol*, 61: 527-32.
- Buratti, E., and F. E. Baralle. 2009. 'The molecular links between TDP-43 dysfunction and neurodegeneration', *Adv Genet*, 66: 1-34.
- Dewannieux, M., S. Blaise, and T. Heidmann. 2005. 'Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses', *J Virol*, 79: 15573-7.
- Douville, R., J. Liu, J. Rothstein, and A. Nath. 2011. 'Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis', *Ann Neurol*, 69: 141-51.
- Douville, R. N., and A. Nath. 2014. 'Human endogenous retroviruses and the nervous system', *Handb Clin Neurol*, 123: 465-85.
- Duperray, A., D. Barbe, G. Raguenez, B. B. Weksler, I. A. Romero, P. O. Couraud, H. Perron, and P. N. Marche. 2015. 'Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4', *Int Immunol*, 27: 545-53.
- Efthymiou, A., A. Shaltouki, J. P. Steiner, B. Jha, S. M. Heman-Ackah, A. Swistowski, X. Zeng, M. S. Rao and N. Malik (2014). "Functional screening assays with neurons generated from pluripotent stem cell-derived neural stem cells." *J Biomol Screen* 19(1): 32-43.
- Geser, F., M. Martinez-Lage, L. K. Kwong, V. M. Lee, and J. Q. Trojanowski. 2009. 'Amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia and beyond: the TDP-43 diseases', *J Neurol*, 256: 1205-14.
- Hardiman, O., L. H. van den Berg, and M. C. Kiernan. 2011. 'Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis', *Nat Rev Neurol*, 7: 639-49.
- Lagier-Tourenne, C., and D. W. Cleveland. 2009. 'Rethinking BAC: the FUS about TDP-43', *Cell*, 136: 1001-4.
- Li, W., M. H. Lee, L. Henderson, R. Tyagi, M. Bachani, J. Steiner, E. Campanac, D. A. Hoffman, G. von Geldern, K. Johnson, D. Maric, H. D. Morris, M. Lentz, K. Pak, A. Mammen, L. Ostrow, J. Rothstein, and A. Nath. 2015. 'Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease', *Sci Transl Med*, 7: 307ra153.
- MacGowan, D. J., S. N. Scelsa, T. E. Imperato, K. N. Liu, P. Baron, and B. Polsky. 2007.

'A controlled study of reverse transcriptase in serum and CSF of HIV-negative patients with BAC', *Neurology*, 68: 1944-6.

Mallet, F., O. Bouton, S. Prudhomme, V. Cheynet, G. Oriol, B. Bonnaud, G. Lucotte, L. Duret, and B. Mandrand. 2004. 'The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1731-6.

Manghera, M., J. Ferguson-Parry, and R. N. Douville. 2016. 'TDP-43 regulates endogenous retrovirus-K viral protein accumulation', *Neurobiol Dis*, 94: 226-36.

McCormick, A. L., R. H. Brown, Jr., M. E. Cudkowicz, A. Al-Chalabi, and J. A. Garson. 2008. 'Quantification of reverse transcriptase in BAC and elimination of a novel retroviral candidate', *Neurology*, 70: 278-83.

Moullignier, A., A. Moullonguet, G. Pialoux, and W. Rozenbaum. 2001. 'Reversible BAC-like disorder in HIV infection', *Neurology*, 57: 995-1001.

Oluwole, S. O., Y. Yao, S. Conradi, K. Kristensson, and H. Karlsson. 2007. 'Elevated levels of transcripts encoding a human retroviral envelope protein (syncytin) in muscles from patients with motor neuron disease', *Amyotroph Lateral Scler*, 8: 67-72.

Perron, H., J. P. Perin, F. Rieger, and P. M. Alliel. 2000. 'Particle-associated retroviral RNA and tandem RGH/HERV-W copies on human chromosome 7q: possible components of a 'chain-reaction' triggered by infectious agents in multiple sclerosis?', *J Neurovirol*, 6 Suppl 2: S67-75.

Polymenidou, M., and D. W. Cleveland. 2011. 'The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in BAC', *Cell*, 147: 498-508.

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

Rosen, D. R. 1993. 'Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis', *Nature*, 364: 362.

Steele, A. J., A. Al-Chalabi, K. Ferrante, M. E. Cudkowicz, R. H. Brown, Jr., and J. A. Garson. 2005. 'Detection of serum reverse transcriptase activity in patients with BAC and unaffected blood relatives', *Neurology*, 64: 454-8.

Taylor, J. P., R. H. Brown, Jr., and D. W. Cleveland. 2016. 'Decoding BAC: from genes to mechanism', *Nature*, 539: 197-206.

Turner, G., M. Barbulescu, M. Su, M. I. Jensen-Seaman, K. K. Kidd, and J. Lenz. 2001. 'Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans', *Curr Biol*, 11: 1531-5.

von Giesen, H. J., R. Kaiser, H. Koller, K. Wetzel, and G. Arendt. 2002. 'Reversible BAC-like disorder in HIV infection. An BAC-like syndrome with new HIV infection and complete response to antiretroviral therapy', *Neurology*, 59: 474; author reply 74-5.

Vucic, S., and M. C. Kiernan. 2009. 'Pathophysiology of neurodegeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis', *Curr Mol Med*, 9: 255-72.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое распознает оболочечный белок HERV-K, при этом указанное антитело связывается с эпитопом, имеющим последовательность согласно SEQ ID NO: 9, и где указанное антитело содержит

легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), которая содержит три определяющих комплементарность участка: CDR-L1, приведенный в SEQ ID NO: 1, CDR-L2, приведенный в SEQ ID NO: 2, и CDR-L3, приведенный в SEQ ID NO: 3; и

тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит три опре-

деляющих комплементарность участка: CDR-H1, приведенный в SEQ ID NO: 4, CDR-H2, приведенный в SEQ ID NO: 5, и CDR-H3, приведенный в SEQ ID NO: 6.

2. Антитело по п.1, в котором указанное антитело, которое распознает оболочечный белок HERV-K, содержит варибельную область (VL) легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 7; и варибельную область (VH) тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 8.

3. Антитело по п.1 или 2, в котором указанное антитело является мышиным моноклональным антителом, химерным моноклональным антителом или гуманизированным моноклональным антителом.

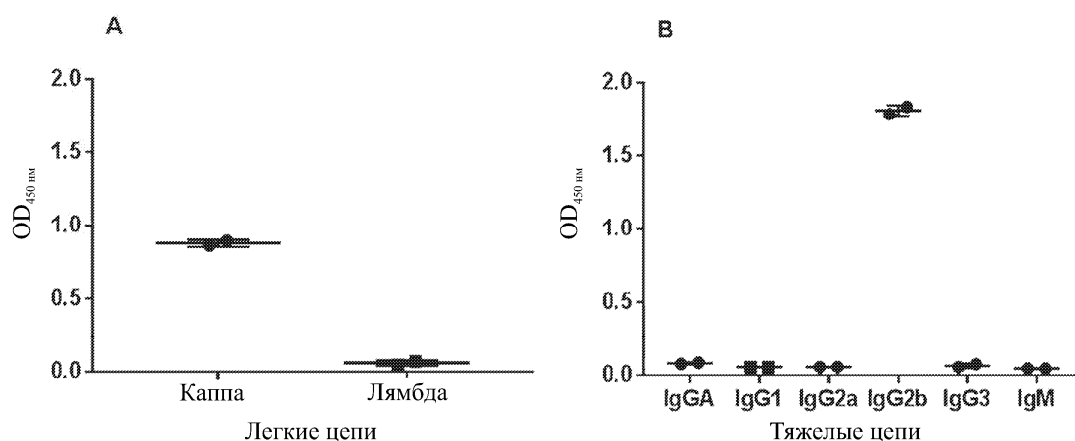
4. Применение антитела по любому из пп.1-3 в лечении бокового амиотрофического склероза (БАС).

5. Применение по п.4, где БАС представляет собой спорадический БАС.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-3 и фармацевтически приемлемый инертный наполнитель.

7. Способ *in vitro* детекции оболочечного белка HERV-K в биологическом образце, содержащий стадию введения указанного биологического образца в контакт с антителом по любому из пп.1-3 к оболочечному HERV-K.

8. Способ *in vitro* диагностирования БАС у пациента, содержащий стадию введения биологического образца, полученного от указанного пациента, в контакт с антителом по любому из пп.1-3 к оболочечному HERV-K.



Фиг. 1

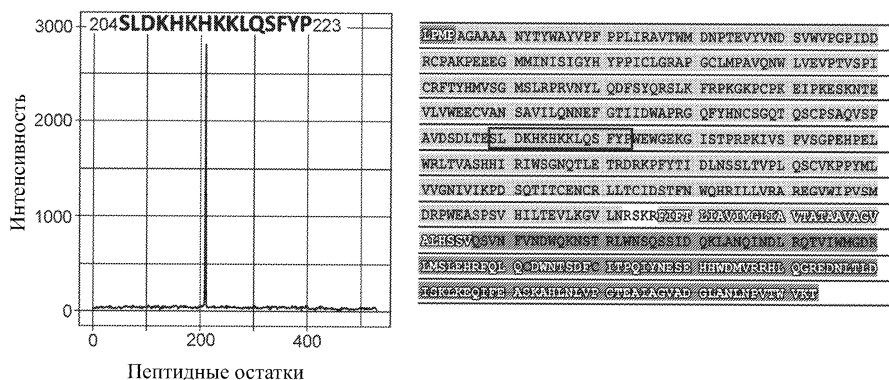
A: GN_mAb Env_K01 варибельная легкая цепь

DVVMQTPTLTLSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPGESPKLLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYICLQATHFPWTFGGGKLEIKRADAAPTVSLFPPSSSEQLTSCGASARVLR

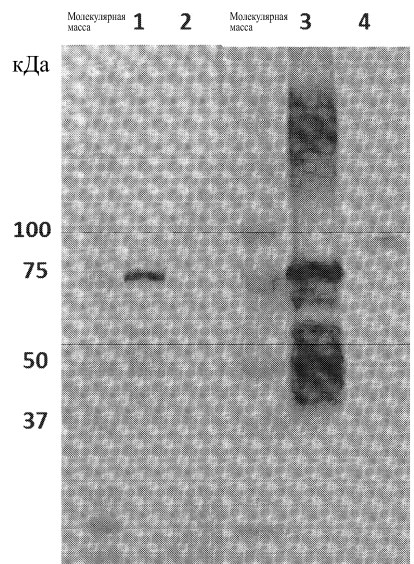
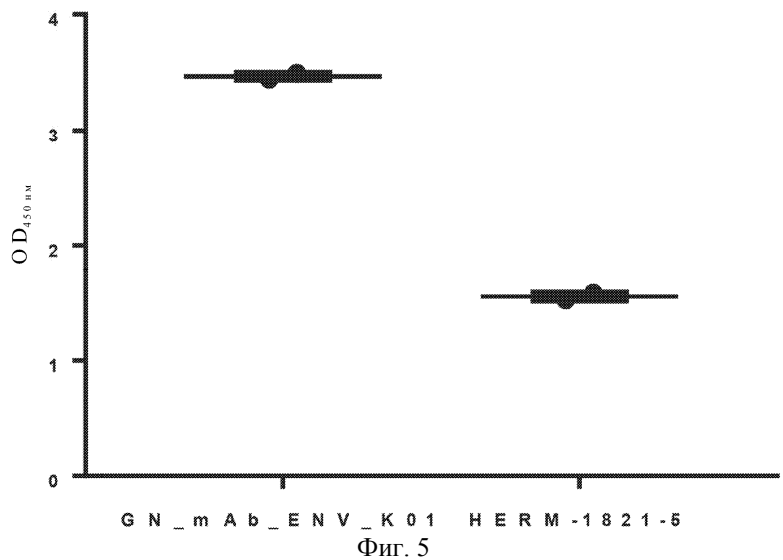
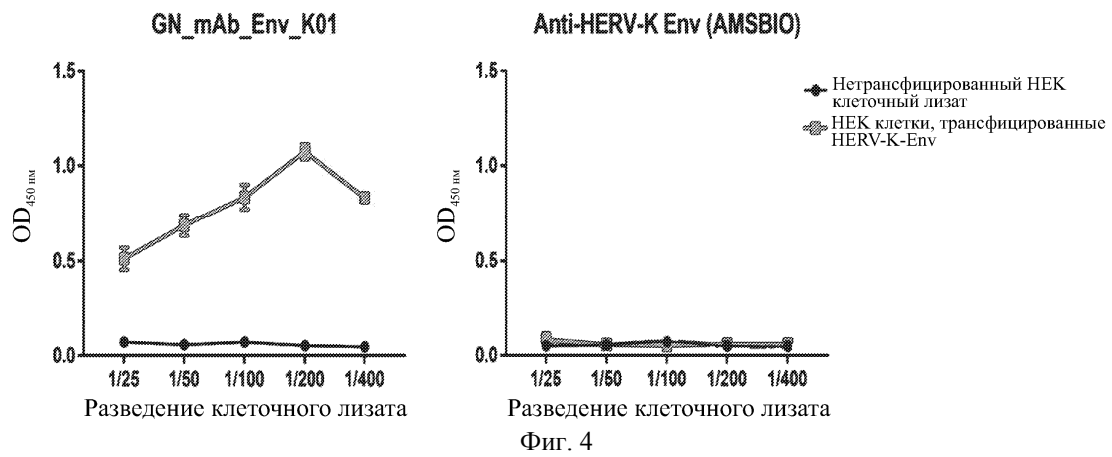
B: GN_mAb Env_K01 варибельная тяжелая цепь

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFSTSYWMMNWQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASLYYYGISLWGQGLTVTVSAAKITPPSYPLAPGCGDITGSSVTLGCLVKGYPFESVTVTWNSGSL

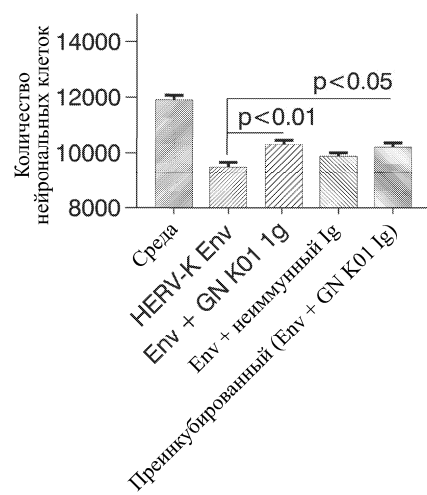
Фиг. 2



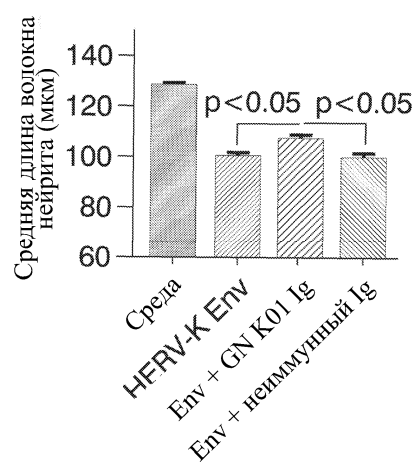
Фиг. 3



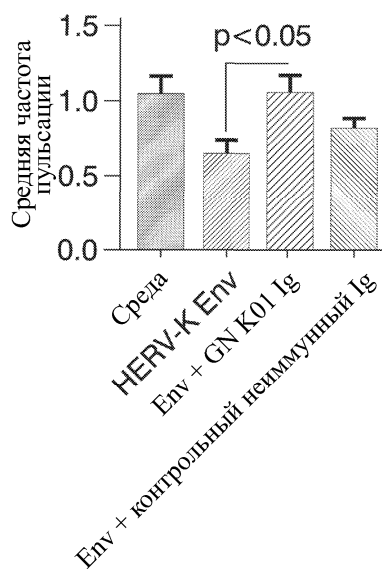
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

